ISBN electronic: 978-606-8236-24-7

Coordonatori:

Simona Ivana

Autori:

Alexandru T. Bogdan   Iulian Țogoe   Gheorghe Câmpeanu
Simona Ivana   Traian Enache   Stelian Bărăitareanu
Ipate Iudith   Alexandru Popescu

MICROBIOLOGIA ALIMENTELOR



Volumul I

Ediție imbunătățită şi revizuită

Editura Asclepius
Bucureşti, 2011

ISBN electronic: 978-606-8236-24-7



Editura Asclepius, Bucureşti
Tel: 072.44.66.481, tel/fax: 021/242.11.01
Website: www.asclepius.ro, e-mail: editura@aslcepius.ro

Cuvânt înainte,

Anul editorial 2010, în domeniul medicinii veterinare marchează apariția unei lucrări deosebite, a unui tratat remarcabil de Microbiologie a alimentelor, atât de necesar într-o perioadă, în care, siguranța şi controlul alimentelor se impune, atât ca prudență profilactică cât şi ca necesitate de aliniere acceptată, la tot ceea ce reprezintă reglementările UE.

Lucrarea de față este realizată pe baza unui material bibliografic extrem de bogat şi recent, care poartă amprenta experienței profesionale şi ştiințifice a autoarei, cadru didactic la disciplina de Microbiologie-Imunologie, din anul 1990.

O lucrare de asemenea dimensiuni (compusă din cinci volume), acoperitoare a domeniului microbiologiei, a însemnat un adevărat curaj conştient, bazat pe competență şi pe obligația resimțită de autor, de a pune la dispoziția celor vizați, nu puțini la număr, medici veterinari, medici umani, oameni de sănătate publică, cercetători, specialişti microbiologi.

Nu în ultimul rând, tratatul se adresează studenților facultăților de medicină veterinară şi medicină umană, chemați să-i înțeleagă importanța, din punctul de vedere al sănătății animale şi al scopului final, Sănătatea Publică.

O asemenea întreprindere de lung respir pune la dispoziția generațiilor tinere, un volum de cunoştințe selecționate şi reprezintă răspunsul evident, la acumularea informațiilor microbiologice şi la aplicațiile rezultatelor cercetării, în domeniul biotehnologiei.

Modul de prezentare, fără reproş, fluent, cu grija cadrului didactic şi al omului de ştiință, pentru limbaj, exprimarea ştiințifică într-un stil clar şi corect mărturiseşte calitățile autoarei. Nu-i uşor să-i convingi pe cei vizați, să participe la o asemenea lucrare, chiar dacă au motivația necesară, nu-i uşor să dai dovadă de perseverență de a începe a urmări, redacta, volumele tratatului, într-un stil unitar.

Volumul prim al Microbiologiei Alimentelor, cuprinde Bacteriologia Generală, morfologia-structura celulei procariote, elemente de nutriție şi metabolism bacterian, creşterea şi multiplicarea, utilizări în biotehnologie, influența factorilor fizici, chimici şi biologici asupra bacteriilor, genuri bacteriene şi ciuperci microscopice (mucegaiuri, levuri) izolate din alimente, sursele principale de microorganisme prezente în alimente, tipuri de fermentații şi produse alimentare.

Mai puțin obişnuit, într-un asemenea tratat este pledoaria pentru cercetare, pentru verificarea ideilor, prin observații şi experimente, care să susțină ipoteza de lucru, alături de deducție şi inducție; sunt enumerate calitățile cardinale ale celor chemați să lărgească orizontul cunoştințelor noastre (curiozitate, lipsa prejudecăților, scepticismul, creativitatea şi cooperarea, revizuirea opiniilor).

Lucrarea meritorie datorată faptului că pune la îndemână cititorilor avizați numeroase informații ştiințifice, deosebit de utile în domeniile microbiologiei alimentelor.

Prof. univ. Dr. Constantin CIUFECU,
UMF Carol Davila,
Membru titular al Academiei de Ştiințe Medicale

Cuprins

Motto:
The most important discoveries of the laws, methods and progress of nature have nearly always sprung from the examination of the smallest objects which it contains.

Capitolul 1
Scurt istoric al microorganismelor din alimente

„Microorganismele care reprezintă obiectul de studiu al microbiologiei alcătuiesc un grup vast şi eterogen, ca morfologie, activitate biologică şi poziţie sistematică având drept caractere comune dimensiunile microscopice care le fac invizibile cu ochiul liber, organizarea în general unicelulară şi structura internă relativ simplă" (Zarnea G., 1983).

În acest grup sunt incluse bacteriile, ciupercile microscopice (drojdii şi mucegaiuri), virusurile şi prionii.

Microbiologia reuneşte ştiinţele biologice care au ca obiect studiul microorganismelor (Gr. *mikos*, mic; Gr. *bios*, viaţă). „Umbrela" microbiologiei a devenit neîncăpătoare pentru complexitatea obiectelor de studiu care intră în structura sa. Ne putem închipui o umbrelă al cărei mâner este reprezentat de imunologie şi pălăria compartimentată în bacteriologie, protozoologie, algologie, micologie, genetică moleculară şi virusologie.

Pentru prima dată, în 1655, Kircher intuieşte existenţa microorganismelor.

Antonie van Leewenhoek (1632-1723) a folosit o lupă de construcţie proprie cu o putere de mărire de 40x (puterea de rezoluţie aproximativ un micron) şi un sistem de iluminare, nedivulgat, probabil de tipul „câmp întunecat". El a raportat observaţiile sale într-o serie de scrisori adresate Societăţii Regale din Londra, iar acestea au fost publicate în limba engleza. El a denumit aceste organisme „wee animalcules".

Microbiologia este o ştiinţă care nu s-a dezvoltat până în a doua parte a secolului al XIX-lea. În secolul XIX s-au pus două întrebări uimitoare, care au dus ulterior la dezvoltarea tehnicilor de investigaţie microscopică şi la înfiinţarea microbiologiei ca ştiinţă:

1. De unde apare generaţia spontană?
2. Care este natura bolilor contagioase?

Teoria generaţiei spontane a fost destul de repede explicată. Dacă alimentele stau mult timp în condiţii neprielnice de mediu, acestea intră în putrefacţie. Dacă sunt examinate la microscop se observă prezenţa unui

număr foarte mare de bacterii. De unde vin aceste bacterii, dacă ele nu se găsesc în alimentele proaspete? Unii cercetători au presupus că sunt nişte germeni care pătrund în aer, în alimente, iar alții că aceştia apar spontan din materia inertă. Pentru prima dată Pasteur a demonstrat că aceste structuri se găsesc în aer, de unde pătrund în materia în putrefacție. El a găsit spontan în aerul obişnuit o varietate de structuri solide de 0,01-1 mm. Multe dintre aceste structuri aparțineau sporilor de ciuperci, chiştilor de protozoare şi altor celule microbiene. Acesta a concluzionat că microorganismele din materiile intrate în putrefacție îşi au originea în aer. El a postulat ideea că aceste corpuri microscopice se depozitează pe toate obiectele din mediul ambiant. A folosit pentru prima dată căldura ca mijloc de sterilizare pentru eliminarea contaminanților. În acelaşi timp mai mulți cercetători au arătat că o soluție cu nutrient, dacă este fiartă nu mai intră în putrefacție.

Principiile tehnicilor aseptice sunt primele lucruri pe care le învață un microbiolog. După ce Pasteur a descoperit sterilizarea prin fierbere, unii cercetători au demonstrat că aceasta este insuficientă. Astăzi, noi ştim că există lucruri rezistente la temperatura de fierbere care poartă denumirea de endospori. Inițial, s-au ocupat de acest lucru doi cercetători: John Tyndall, în Anglia şi Ferdinand Cohn, în Germania. Ei au observat că unele alimente (de exemplu: sucul de fructe) se sterilizează în 5 minute, prin fierbere, pe când altele au nevoie de o perioadă mai lungă de timp.

Pentru prima dată Cohn a descoperit la microscop, în culturile vechi endosporul la unele specii din genul *Bacillus*.

Descoperirile făcute de către Ignaz Semmelweis şi Joseph Lister au arătat că unii germeni se pot transmite de la o persoană la alta putând provoca îmbolnăviri.

Koch a publicat în 1876 studiile sale timpurii privind bacilul antraxului. El a descoperit că acesta există în sângele animalelor infectate. Koch a demonstrat că dacă recoltează sânge de la un animal bolnav şi îl inoculează la altul, acesta se îmbolnăveşte şi moare. Repetând această procedură de 20 de ori (transfer de sânge de la un animal la altul) a demonstrat că bacteria este capabilă să producă antrax. Cel de al douăzecilea animal a murit la fel ca primul. În primul caz, Koch a demonstrat prin microscopie, că sângele animalului mort conține un număr mare de bacterii. Koch a dus experimentul mai departe şi a demonstrat că, dacă bacteria este cultivată în afara corpului pe medii de cultură reprezentate de medii nutritive, poate cauza boala când este reinoculată la un animal sănătos. Atât bacteriile izolate din infecții, cât şi cele din bulion nutritiv induc aceleaşi simptome după inocularea animalelor sănătoase.

Pe baza acestor experimente şi a altora Koch a formulat nişte concluzii care poartă denumirea de postulatele lui Koch:

1. microorganismele patogene pot fi izolate constant de la animalele bolnave şi nu sunt prezente la cele sănătoase;
2. microorganismele pot fi recoltate de la animalele bolnave şi cultivate pe medii de cultură;
3. dacă un patogen este inoculat la un animal susceptibil acesta se va infecta şi vor fi reproduse simptomele caracteristice bolii;
4. microorganismele reizolate de la animale de experienţă şi cultivate din nou în laborator sunt aceleaşi cu acelea care au produs infecţia originală.

Postulatele lui Koch au prezentat o importanţă deosebită nu numai pentru că au arătat că bolile infecţioase sunt produse de microorganisme, dar au participat şi la dezvoltarea microbiologiei prin cultivarea acestora în condiţii de laborator.

Cu toate că este dificilă precizarea cu exactitate a începutul cunoştinţelor în ceea ce priveşte prezenţa şi rolul microorganismelor din alimente, la această dată este cunoscut că acestea devansează însăşi microbiologia ca ştiinţă de sine stătătoare.

Perioada ce precede stabilirea microbiologiei ca ştiinţă ar putea fi definită ca „era preştiinţifică”. Această eră poate fi la rândul ei divizată în două perioade: „perioada culegătorilor” şi „perioada cultivatorilor”. „Perioada culegătorilor” îşi are debutul odată cu originea omului (în urmă cu un milion de ani) şi se încheie în urmă cu aproximativ 8000 de ani. În această perioadă se presupune că oamenii erau carnivori, plantele intrând mult mai târziu în dieta lor. Tot în acea vreme se consideră că pentru prima dată s-a recurs la prepararea termică a hranei. Perioada ce a urmat acesteia se presupune că a fost cea în care au apărut problemele legate de alterarea alimentelor gătite şi conservate în condiţii necorespunzătoare. De altfel prima consemnare despre alterarea alimentelor este semnalată în jurul anului 6000 îHr.

În urma cercetării unor documente din antichitate istoricii au stabilit că în acea perioadă exista o legătură destul de puternică între coacerea cerealelor şi fabricarea berii. Berea preparată în antichitate avea aspectul unei grăsimi groase, închise la culoare, era slab alcoolizată, dar nutritivă. Cercetarea urmelor de cereale şi bere găsite în mormintele Egiptului antic au demonstrat că zahărul necesar pentru fermentaţie influenţează calitatea acestora. Tablele babiloniene de lut din 4300 îHr. descriu în detaliu reţetele de fabricare a berii. Berea a fost preparată şi în China antică, în imperiul incaş şi de către asirieni. Un text egiptean datat din 1600 îHr. prezintă peste 100 de feluri diferite de preparare a berii.

Fabricarea şi comercializarea berii a început în 1200 dHr. în Germania, pentru ca în 1506 să fie emisă aşa numita Lege Germană a Purităţii Berii care stabileşte că ingredientele berii sunt numai: apa pură,

hameiul, orzoaica şi grâul, ajungându-se în zilele noastre la peste 20.000 de tipuri de bere fabricate în întreaga lume. Pentru prima dată îmbutelierea berii s-a realizat în 1605, cunoscându-se în zilele noastre peste 180 de moduri de îmbuteliere.

Primele vase de fiert au fost folosite în Orientul Apropiat acum aproximativ 8000 de ani. Cu ajutorul lor s-a realizat fierberea cerealelor, prepararea berii şi s-au conservat alimentele. În Babilon berea a fost preparată pentru prima dată în jurul anului 7000 îHr. Sumerienii (anul 3000 îHr.) au fost primii crescători de animale şi primii care au preparat untul. Tot ei au produs o serie de preparate din carne, peşte, şuncă, piei uscate sărate, grâu, ovăz. Vasele de lut au fost aduse din Orientul Apropiat în Europa de Vest în jurul anul 5000 îHr.

Laptele şi brânza au fost folosite de egipteni încă de acum 3000 de ani îHr. Evreii au folosit între anii 3000 -1200 îHr sarea din Marea Moartă pentru conservarea diferitelor alimente. Chinezii şi grecii foloseau în dieta lor peştele sărat, iar romanii cărnurile murate.

Vinul a fost preparat pentru prima dată de către asirieni în anul 3500 îHr. Cârnații fermentați au fost făcuți şi consumați pentru prima dată de către babilonieni şi chinezi încă din anul 1500 îHr. O altă metodă de conservare apărută în această perioadă presupunea utilizarea diferitelor uleiuri precum cel de măsline sau de susan.

Conform relatărilor lui Seneca, romanii foloseau încă din anii 1000 îHr. zăpada pentru conservarea fructelor de mare şi a altor alimente perisabile. Se pare că tot în această perioadă au apărut practica afumării cărnurilor, fabricarea brânzeturilor şi a vinurilor. Este îndoielnic faptul că oamenii din acel timp au înțeles natura acestor noi tehnici de conservare şi modul de transmitere a diferitelor toxiinfecții alimentare sau pericolul consumului de carne de la animalele bolnave. Până la înțelegerea naturii toxiinfecțiilor alimentare şi a alterării alimentelor, în perioada 0-1100 dHr. ergotoxina (Ergot) produsă de *Claviceps purpurea* a fost cauza multor îmbolnăviri şi decese. În 943 dHr. au fost înregistrați peste 40.000 de morți numai în Franța, neştiindu-se că această boală este produsă de toxina unui mucegai.

Meseria de măcelar este menționată pentru prima dată în 1156 în Elveția, iar din 1248 elvețienii au început să împartă cărnurile în comerciabile şi necomerciabile. În 1276 a fost înființat primul abator la Augsburg.

Cu toate că în secolul al XIII-lea oamenii erau conştienți de atribuțiile calității cărnii, legătura dintre calitatea cărnurilor şi microorganisme era foarte puțin cunoscută.

Prima persoană care a făcut referire la rolul microorganismelor din alimentele alterate a fost A. Kircher, un călugăr care în anul 1658 a

examinat cadavrele în descompunere, carnea, laptele etc., descriind microorganismele ca pe nişte „viermi invizibili”. Descrierile acestuia nu erau precise şi nu au fost acceptate pe scară largă.

În 1765, Lazzaro Spallanzani (1729-1799) a fiert carnea de vită timp de o oră, a sigilat-o şi a observat că aceasta nu s-a alterat. Spallanzani a făcut acest experiment pentru a respinge doctrina ce susținea apariția spontană a vieții.

În 1837, Schwann a arătat că infuziile încălzite rămân sterile dacă se introduce aer prin intermediul unor spirale încălzite. Cu toate că ambii cercetători au demonstrat ideea sterilizării alimentelor prin căldură nici unul nu s-a folosit în practică de aceste descoperiri.

Conservarea termică a alimentelor a fost realizată şi de D. Papin şi G. Leibniz la începutul secolului 18.

Istoria fabricării primelor conserve necesită o scurtă biografie a lui Nicolas Appert (1749-1841). Acest francez a muncit în vinoteca tatălui său. Împreună cu cei doi frați a deschis în 1778 o berărie. După descoperirea unei modalități de conservare (1789-1793) a deschis o fabrică de conserve în 1802 şi a început să exporte produsele şi în alte țări. În 1809 un ministru francez l-a încurajat să-şi promoveze descoperirea. În 1810 a publicat metoda sa şi a fost recompensat cu 12.000 franci. Acesta a fost începutul conservării în cutii, care este practicată şi în ziua de astăzi. Acest experiment a avut loc cu 50 de ani înainte ca L. Pasteur să demonstreze rolul microorganismelor în alterarea vinului. În 1837 acesta a demonstrat că acrirea laptelui se datorează acțiunii microorganismelor şi a folosit pentru prima dată căldura pentru a distruge microorganismele din vin şi bere. Acest mod de sterilizare este cunoscut în ziua de astăzi sub denumirea de pasteurizare. După ce Pasteur a descris fermentația alcoolică ca fiind un proces biologic complex, Buchner, în 1897 demonstrează natura enzimatică a acesteia.

Louis Pasteur (1822 - 1895), geniu al microbiologiei, dar şi chimist, biolog si imunolog este cel care a înființat primele laboratoare de cercetare, iar contribuțiile sale în domeniul microbiologiei alimentare sunt, printe multe altele, despre cauzele alterării perioadice a vinului. Acesta a fost angajat de către producătorii francezi de vin care vroiau să afle ce stă la baza transformării vinului în oțet şi a gustului acru rezultat. Până la acel moment, formarea vinului fusese considerată un proces strict chimic. După studierea aprofundată a fabricării berii şi a folosirii strugurilor la producerea vinurilor, Pasteur a ajuns la concluzia că vinul, „atât cel fin cât şi cel mai puțin fin”, era rezultatul unei acțiuni microbiene asupra sucului de struguri, iar „îmbolnăvirea” acestuia era produsă de microorganismele contaminate care produceau produse nedorite (de exemplu: acid). La acea vreme nu se ştia că răspunzători de aciditatea vinurilor erau probabil

contaminanții bacterieni, cum ar fi *Acetobacter* sau *Gluconobacter* introduşi odată cu strugurii, aerul sau aparatura de preparare a vinului. Aceste bacterii Gram negative obişnuite reduc în continuare etanolul în acid acetic fiind utilizate în prezent în producția industrială de oțet.

Astfel, Pasteur dovedeşte că fermentația este „un act corelativ unui proces vital”, şi că „o fermentație determinată are fermentul său determinant”. Prin extinderea cercetărilor asupra fermentațiilor, el a reuşit să evidențieze originea infecțioasă într-o serie de boli ale berii şi vinului. Demonstrarea rolului crucial al drojdiilor în procesul fermentațiilor a constituit primul concept care asocia modificările fizico-chimice ale materiei organice cu activitatea unui microorganism. Pentru a soluționa problema degradării vinului şi berii, Pasteur propune o tehnică care şi astăzi este utilizată: încălzirea slabă sau pasteurizarea sucului de struguri pentru distrugerea contaminanților urmată de inocularea acestuia cu o cultură pură de levuri. El a lansat de asemenea ideea că un singur microb poate fi răspunzător atât de degradarea produsului cât şi de îmbolnăvirea acestuia. Tehnica pasteurizării a fost ulterior aplicată în industrializarea laptelui şi ca procedeu de sterilizare în practica medicală. De asemenea, Pasteur stabileşte că între activitatea unui agent patogen şi particularitățile pe care le determină exista o anumită specificitate.

Descoperiri istorice

Conservarea alimentelor

1782 – Se semnalează pentru prima dată conservarea oțetului la cutii de către un chimist suedez.

1810 – În Franța, Nicolas Appert patentează conservarea alimentelor, iar în Marea Britanie, Peter Durand obține un patent de conservare a alimentelor în „sticle, vase de lut, de tablă şi alte metale sau materiale potrivite”. Patentul este achiziționat mai târziu de către Hall, Gamble şi Donkin (probabil de la Appert).

1813 – Se introduce practica incubării la postprocesare a alimentelor conservate de către Donkin, Hall şi Gamble.

1825 – T. Kensett şi E. Daggett câştigă în SUA un patent destinat conservării alimentelor în cutii de metal.

1835 – Newton obține un patent în Anglia pentru producerea laptelui condensat.

1837 – Se conservă porumbul la cutii de către I. Winslow.

1839 – În SUA se folosesc pe scară largă cutiile de tablă.

1840 – Se conservă pentru prima dată în cutii fructele şi peştele.

1843 – I. Winslow în Maine încearcă pentru prima dată sterilizarea cu aburi.

1845 – S. Elliott introduce în Australia conservarea la cutii.

1853 – Se obține un patent pentru sterilizarea mâncării prin autoclavare de către R. Chevallier – Appert.

1854 – Pasteur începe cercetările pe vin. Îndepărtarea microorganismelor prin încălzirea acestuia este utilizată pe scară largă din 1867 – 1868.

1855 – Grimwade obține laptele praf în Anglia.

1856 – În SUA este introdus un patent pentru producerea de lapte condensat neîndulcit de către Gail Borden.

1865 – În Statele Unite se utilizează pe scară largă înghețarea artificială a peştelui.

1874 – Se utilizează uzual gheața la conservarea cărnii transportate pe mare.

1878 – Are loc primul transport de carne din Australia către Anglia.

1880 – În Germania este introdusă pasteurizarea laptelui.

1882 – Krukowitsch descrie pentru prima dată efectul distructiv al ozonului asupra bacteriilor.

1886 – Se încearcă pentru prima dată un proces mecanizat de uscare a fructelor şi legumelor de către A.F. Spawn.

1886 – În SUA se pune la punct tehnologia înghețării artificiale a ouălor.

1890 – În SUA este utilizată pasteurizarea comercială a laptelui. Se pune la punct tehnologia refrigerării mecanice a fructelor depozitate.

1895 – Russel realizează primul studiu bacteriologic al alimentelor conservate.

1907 – E. Metchnikoff izolează din iaurt o bacterie pe care a denumit-o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus, iar BTP Barker studiază rolul bacteriilor acido-acetice în producerea cidrului.

1908 – Se utilizează primul conservant - benzoatul de sodiu - în Statele Unite.

1916 – Înghețarea rapidă a alimentelor este pentru prima dată folosită în Germania de către R. Plank, E. Ehrenbaum şi K. Reuter.

1917 – Franks patentează prezervarea fructelor şi legumelor folosind dioxidul de carbon.

1920 – Biogelow şi Esty efectuează primul studiu sistematic al rezistenței endosporilor la căldură.

1922 – Esty şi Meyer au stabilit valoarea lui $z=18^{o}F$ pentru endosporii de *Clostridium botulinum.*

1929 – În Franța este patentată folosirea radiațiilor de înaltă energie în procesarea alimentelor.

1943 – B.E. Proctor foloseşte în SUA radiațiile ionizante pentru conservarea cărnii de hamburger.

1950 – Conceptul de valoare D (temperatura) a intrat în uzul general.

1955 – Se aprobă folosirea acidului ascorbic pentru conservarea diferitelor alimente şi a clortetraciclinei la carnea proaspătă de pui şi mai târziu a oxitetraciclinei. În 1966 se renunță la folosirea acestor antibiotice.

1967 – În SUA are loc pentru prima dată iradierea alimentelor.

1988 – Nizinei i se acordă statutul de GRAS (generally regarded as safe) în SUA.

1990 – În SUA este aprobată utilizarea iradierii la carnea de pui.

1997 – În SUA este aprobată iradierea cărnii proaspete de vită la un nivel maxim de 4,5 kGy şi a cărnii de vită înghețate la 7,0 kGy. Tot în SUA ozonul este declarat GRAS.

Alterarea alimentelor.

1659 – Kircher demonstrează prezența bacteriilor din lapte, fapt confirmat de Bondeau în 1847.

1680 – Antonie van Leewenhoek (1632-1723), prima persoană care observă prin mărirea cu ajutorul microscopului simplu (o singură lentilă de construcție personala), intuieşte existența drojdiilor. Astfel, Leewenhoek a atras atenția asupra microorganismelor, fără a le conferii statutul de organisme aparte.

1780 – Scheele, chimist suedez, identifică acidul lactic (acidul 2-hidroxipropanoic) ca fiind principalul acid din laptele acru.

1839 – Latour demonstrează existența drojdiilor.

1857 – Pasteur arată că acrirea laptelui este produsă de microorganismele care se dezvoltă în el.

1866 – Se publică lucrarea *Etude sur la Vin* a lui Pasteur.

1873 – Se comunică un prim studiu despre deteriorarea microbiologică a ouălor, realizat de către Gayon. Lister izolează pentru prima dată *Lactococcus lactis* în cultură pură.

1878 – Cienkowski face un prim studiu microbiologic al zahărului deteriorat, din care izolează microorganismul *Leuconostoc mesenteroides*

1887 – Forster demonstrează pentru prima dată abilitatea unor culturi pure de bacterii de a creşte la 0ºC.

1888 – Miquel a fost primul care a studiat bacteriile termofile.

1895 – Pentru prima dată este determinat numărul de bacterii din lapte de către Von Geuns în Amsterdam.

1902 – Termenul psihrofil este pentru prima dată folosit de către Schmidt-Nielsen pentru microorganismele care se dezvoltă la temperaturi scăzute.

1912 – Termenul osmofil este dat de către Richter pentru a descrie fungii care se dezvoltă bine într-un mediu cu presiune osmotică mare.

1915 – *Bacillus coagulans* este pentru prima dată izolat din laptele

coagulat de către B.W. Hammer.

1917 – *Geobacillus stearothermophilus* este pentru prima dată izolat din crema cu cereale de către PJ Donk.

1933 – În Anglia Oliver şi Smith observă alterarea produsă de *Byssochlamys fulva*; a fost descris pentru prima dată în SUA în 1969 de către D. Maunder.

Alimente nocive.

1820 – Poetul german Justinus Kerner face o descriere a „cârnaților otrăviți" (cel mai probabil fiind vorba de botulism) şi a ratei lor înalte de fatalitate.

1857 – În Penrith, Anglia, laptele este incriminat în transmiterea febrei tifoide de către W. Taylor.

1870 – Francesco Selmi a avansat teoria otrăvirii cu ptomaină pentru a explica îmbolnăvirile contactate în timpul consumului de alimente.

1888 – Gaertner izolează pentru prima dată *Salmonella enteritidis* dintr-o probă de carne care a determinat 57 cazuri de toxiinfecție alimentară.

1894 – T Denys este primul care asociază stafilococii cu toxiinfecțiile alimentare.

1896 – Se descoperă *Clostridium botulinum* de către Van Ermengen.

1904 – Tulpinile de tip A de *C. botulinum* sunt identificate de G. Landman.

1906 – Se recunosc toxiinfecțiile alimentare produse de *Bacillus cereus*. Se identifică primul caz de difilobotriază.

1926 – Pentru prima dată se face legătura dintre intoxicații şi streptococi ca agenți etiologici de către Linden, Turner şi Thom.

1937 – Tulpinile de tip E de *C. botulinum* au fost identificate de L. Bien şi E. Hazen.

1938 – În Ilinois (SUA) sunt semnalate epidemii produse de *Campylobacter enteritis*.

1939 – Se descriu pentru prima dată gastroenterite cauzate de *Yersinia enterocolitica* de către Schleifstein şi Coleman.

1945 – Mc Clung izolează pentru prima dată *Clostridium perfringens* (*welchii*) din cazuri de toxiinfecții alimentare.

1951 – *Vibrio parahaemolyticus* este recunoscut drept agent cauzal al toxinfecțiilor alimentare pe baza studiilor lui T. Fujino în Japonia.

1955 – S. Thompson evidențiază asemănările dintre holeră şi gastroenteritele produse de *E. coli* la copii.

Au fost recunoscute intoxicațiile cu scombroid (produs asociat cu histamina).

1960 – Se identifică tipul F de *C. botulinum*. Se raportează producția

de aflatoxine de către *Aspergillus flavus.*

1969 – Se pune în evidență enterotoxina lui *C. perfringens* de către C.L. Duncan şi D.H. Strong. Gimenez şi Ciccarelli izolează pentru prima dată tipul G de *C. botulinum.*

1971 – În statul Maryland (SUA) are loc prima epidemie de gastroenterită cu *Vibrio parahaemolyticus*.

1975 – L.R. Koupal şi R.H. Deibel demonstrează prezența enterotoxinei stafilococice.

1976 – Gastroenteritele cu *Yersinia enterocolitica* apar pentru prima dată în USA, la New York

1978 – În Australia apar pentru prima dată epidemii de gastroenterite cu virusul Norwalk.

1979 – Apar în Florida gastroenterite cauzate de *Vibrio cholerae non-01.* Mai devreme au apărut în Cehoslovacia (1965) şi Australia (1973)

1983 – Ruiz-Palacios et al. descriu enterotoxina produsă de *Campylobacter jejuni*.

1981-1984 – Prusiner demonstrează că moleculele proteice numite prioni pot fi infecţioase pentru om şi animal. Este descrisă encefalopatia spongiformă bovină în Regatul Unit al Marii Britanii şi Irlandei de Nord.

Descoperirea microscopului. Chiar şi în perioada civilizațiilor timpurii s-a observat că unele alimente alterate devin necomestibile sau provoacă toxiinfecții alimentare, iar altele devin delicatese prin acelaşi procedeu. Boli precum pesta neagră şi variola erau considerate cu numai câteva secole în urmă ca fiind produse de un tip oarecare de agent transmisibil. Deşi Zaccharias Jonnsen, fabricant olandez de ochelari şi Galileo Galilei, gânditorul care a deschis o eră nouă în cercetarea ştiințifică, bazată nu numai pe observația directă a naturii, au inventat lupa, microscoapele lor erau lipsite de claritatea şi optica necesară examinării bacteriilor sau altor organisme mici, unicelulare.

Primele descrieri exacte au aparut o dată cu inventarea microscopului ingenios cu un singur obiectiv confecționat de Antony van Leeuwenhoek, un negustor olandez de pânză şi microbiolog autodidact. Investigațiile ample ale lui Leeuwenhoek au fost efectuate pe organisme minuscule, pe care le-a numit animalcules (animale mici), pe sange şi pe alte țesuturi umane (inclusiv propriile sale produse de raclare a dinților), pe insecte, minerale şi materiale vegetale. El a construit peste 250 de microscoape mici, cu putere de rezoluție mare, care puteau mări până la 300 de ori. Descrierile bacteriilor şi protozoarelor erau competente şi precise, în special ținând seama de faptul că el nu a avut o pregătire ştiințifică specială, fiind primul care a studiat această lume nouă şi ciudată. Datorită contribuției sale extraordinare la întemeierea microbiologiei este

considerat părintele acestei ştiinţe.

În timp, microscoapele au evoluat devenind instrumente complexe şi perfecţionate, prin adăugarea unor lentile mai fine, a unui condensator, a unor dispozitive de reglare, precum şi a unor surse de lumină incorporate în microscop.

Prototipul microscopului modern, folosit de la mijlocul anilor 1800 este capabil de o mărire de 1000 ori sau mai mult. Microscoapele moderne nu diferă mult ca structură şi funcţie de bază de unele microscoape iniţiale.

Dezvoltarea metodei ştiinţifice. Abordarea generală adoptată de oamenii de ştiinţă pentru explicarea unui anumit fenomen natural, reprezintă ceea ce numim o metodă ştiinţifică.

Prima etapă a unei astfel de metode o reprezintă formularea unei ipoteze. O ipoteză adevărată trebuie să fie capabilă de a fi confirmată sau infirmată, printr-o observare sau experimentare atentă, sistematică. De exemplu, afirmaţia: „albinele fac miere din polen” poate fi demonstrată experimental prin argumente ştiinţifice, însă afirmaţia: „albinele bâzâie pentru că sunt fericite” nu poate fi demonstrată.

Cele două tipuri de raţionament aplicate de obicei separat sau în asociere pentru a elabora şi susţine o ipoteză sunt *inducţia* şi *deducţia.* Prin procesul inductiv, un om de ştiinţă acumulează date sau fapte ştiinţifice şi apoi formulează o ipoteză generală, care explică aceste fapte. Abordarea inductivă are loc prin întrebarea, „sunt oare fenomenele observate cel mai bine explicate prin această ipoteză sau prin alta?”.

În abordarea deductivă, un om de ştiinţă construieşte o ipoteză, testează valabilitatea acesteia, conturează evenimente deosebite care sunt prevazute de ipoteză şi apoi efectuează experimente pentru testarea acestor evenimente. Procesul deductiv se stabileşte prin ideea că „dacă ipoteza este valabilă este de aşteptat să se producă anumite evenimente specifice”.

Un proces îndelungat de experimentare, analiză şi testare duce în final la concluzii care susţin sau infirmă ipoteza.

Dacă ipoteza este susţinută de rezultatele experimentului, ea nu trebuie să fie acceptată imediat ca o realitate. Rezultatele trebuie publicate şi repetate şi de alţi cercetători. Istoria ştiinţei abundă de rămăşiţele unor ipoteze aparent ingenioase, care pur şi simplu nu au putut fi repetate şi de aceea în final au fost respinse.

Pe măsură ce fiecare ipoteză este susţinută de un număr din ce în ce mai mare de date supravieţuind unei examinări riguroase, aceasta se va ridica la nivelul următor de acceptare, reprezentat de teorie.

O teorie reprezintă o colecţie de afirmaţii, propuneri sau concepte, care explică sau justifică un fenomen natural. O teorie nu este rezultatul unui singur experiment repetat mereu, ci reprezintă o întreagă acumulare

de idei care exprimă sau explică multe aspecte ale unui fenomen. Nu este o explicație confuză și șubredă, ci o declarație viabilă, care a rezistat probei timpului, dar care mai poate fi încă infirmată, prin argumente științifice serioase.

De cele mai multe ori se întâmplă ca o teorie să se dezvolte și să progreseze pe parcursul a mai multor decenii de cercetare, putând fi completată și modificată prin date noi.

La un moment dat, dovada exactității și previzibilității unei teorii, devine atât de convingătoare, încât este atins nivelul următor de încredere, iar teoria devine lege sau principiu. De exemplu, deși ne mai putem referi încă la „teoria germenilor ca o cauză a bolilor", au mai rămas atât de puține îndoieli cu privire la faptul că microbii pot provoca boli și astfel este clar că teoria a devenit lege.

Caracteristicile care fac ca oamenii de știință să fie eficienți în munca lor sunt curiozitatea, lipsa de prejudecăți, scepticismul, creativitatea, cooperarea și faptul că sunt de acord să-și revizuiască părerile asupra proceselor naturale.

Capitolul 2
Clasificarea microorganismelor și rolul lor în alimentație

Adesea discuțiile ce au ca subiect microorganismele sunt disconfortante și fără o analiză judicioasă, au un nemeritat impact negativ. Bineînțeles că teama este justificată de efectele nefavorabile produse de microorganismele patogene asupra populației umane, iar necunoașterea rolului jucat de fiecare dintre microorganisme în ecosisteme, face ca distrugerea lor să producă mai mult rău decât bine. Numeroase microorganisme sunt saprofite, iar unele dintre acestea, incluzând aici bacterii, virusuri, drojdii, mucegaiuri și protozoare ocupă un loc important în industria alimentară.

Bacteriile, organisme prezente în aproape toate ecosistemele naturale, sunt bine definite biologic prin tipul de organizare procariot. Acest tip de organizare este caracterizat prin absența structurilor intracelulare delimitate de membrane, spre deosebire de tipul eucariot la care nucleul și unele organite intracelulare (cloroplaste, mitocondrii) posedă membrane proprii. Aspectul exterior al celulelor (mărimea, forma) definesc morfologia lor, iar modul de grupare ajută la clasificarea celor cu morfologii asemănătoare (de exemplu: diplo-, strepto-, stafilo-).

Virusurile sunt microorganisme extrem de mici, care pentru a se replica utilizează resursele celulei gazdă de tip vegetal, animal sau bacterian. Virusul este în principal un pachet de material genetic care trebuie reprodus de gazdă.

Drojdiile şi mucegaiurile sunt fungi ce nu conțin clorofilă. Acestea au dimensiuni variabile, de la organisme unicelulare la ciuperci mari. Deşi unele dintre ele sunt organisme pluricelulare, strucural acestea nu au rădăcini, tulpini şi frunze. Adevărații fungi au miceliu format din conglomerate de hife. În funcție de tipul organismului, acestea se pot reproduce prin diviziune, înmugurire (ex.: drojdiile) sau sporulare.

Protozoarele (*protózoo* [Gr.] - *primul animal*), sunt organisme unicelulare (de ex.: amoebele) considerate în categoria regnului animal, datorită formelor diferite (heteromorfe) în care trăiesc, faptului că sunt „mobile" şi a prezenței nucleului. Acestea pot produce boli la oameni şi animale. Din cele aproximativ 40000 specii cunoscute circa 8000 sunt parazite, din care 70 parazitează pe om şi numai 40 din ele sunt patogene.

Taxonomia este ştiința care se ocupă cu stabilirea legilor de clasificare şi sistematizare a domeniilor din realitate cu o structură complexă, ce are ca obiect, în cazul ştiințelor vieții, stabilirea principiilor şi legilor de clasificare a organismelor vii. Clasificarea organismelor vii presupune împărțirea sistematică, repartizarea pe clase sau într-o anumită ordine a acestora. Ideal aceste scheme sunt bazate pe legături evoluționiste (relații evolutive între tipurile de organisme). Astfel, clasificarea (taxonomia) se ocupă de:

- stabilirea criteriilor pentru identificarea organismelor şi desemnarea grupurilor;
- aranjarea organismelor în cadrul grupelor (de exemplu: cât de largi sau cuprinzătoare vor fi grupele: la ce nivel de diferențiere ar trebui o specie împărțită în două sau mai multe specii?);
- studierea proceselor evolutive care au avut ca rezultat formarea acestor grupuri.

Taxonul reuneşte un grup sau categorie de organisme înrudite, spre exemplu la cel mai mic nivel speciile formează o categorie taxonomică denumită gen, iar toate organismele sunt reunite în regnuri şi domenii. Sunt acceptate două chei caracteristice ale taxonilor:

- Membrii taxonilor de nivel inferior (ex: speciile) sunt mult mai asemănători decât cei care fac parte din taxoni de nivel mai mare (regn sau domeniu).
- Membrii unui anumit taxon sunt mai asemănători între ei comparativ cu alții ce aparțin altui taxon aflat pe acelaşi nivel erarhic (ex: om versus urangutan – om versus Escherichia coli).

Astfel, odată cunoscută apartenența la un taxon a două organisme

distincte este posibilă deducerea unor asemănări între acestea (de exemplu: toți membrii familiei *Enterobacteriaceae* sunt bacili, facultativ anaerobi şi Gram-negativi).

Trebuie reținut că taxonii sunt într-o continuă schimbare, dependent de nivelul de cunoaştere al fiecărui organism şi de descifrarea relațiilor evoluționiste. În lumea ştiințifică raportarea la un anumit microorganism se face prin precizarea numelui ştiințific. În nomenclatura binomială, organismele sunt definite prin utilizarea a două cuvinte (excepție fac virusurile), ce corespund numelui de gen şi specie - două nivele taxonice succesive. În transcrierea numelui sunt utilizate o serie de convenții internaționale, aşa numitele convenții ale nomenclaturii binominale:

- Genul se pune înaintea speciei (ex.: *Escherichia coli*);
- Numele genului este întotdeauna scris cu literă mare (ex: ***E**scherichia*);
- Numele speciei nu este niciodată scris cu literă mare (ex.: *Escherichia **c**oli*);
- Ambele nume sunt întotdeauna scrie fie în italic, fie cu subliniere (ex.: *Escherichia coli* sau Escherichia coli);
- Numele genului poate fi utilizat şi singur, dar niciodată nu se utilizează singur doar numele speciei (se poate spune sau scrie „*Escherichia*" dar nu este aprobată exprimarea sau scrierea *„coli"*);
- Numele genului poate fi abreviat, dar la prima utilizare a lui trebuie folosit fără abreviere, dacă va fi utilizată abrevierea aceasta se foloseşte împreună cu numele speciei (ex: *E. coli*). Abrevierea nu trebuie să fie ambiguă. Dacă abrevierea prin utilizarea primei litere nu este ambiguă, ea trebuie utilizată doar pentru acel gen (ex. abrevierea *E. coli* este pertinentă dacă în lucrarea respectivă nu mai este prezentat un alt gen al cărui nume începe cu aceeaşi literă). Abrevierea genului este acceptată numai în conjuncție cu numele speciei (ex. *E. coli*).

Tulpinile - Când o specie microbiană este luată în discuție ca o categorie (în general netaxonomică) sub cea a speciei aceasta uzual este definită ca tulpină. În unele situații tulpinile sunt echivalente cu rasele sau subspeciile diferitelor plante sau animale. Doi membrii ai aceleiaşi tulpini sunt mai asemănători între ei decât față de oricare altul care aparține altei tulpini, chiar dacă toate cele trei organisme sunt membrii aceleiaşi specii.

Speciile bacteriene - O specie bacteriană este definită prin caracteristicile asemănătoare ale membrilor ce o compun. Proprietăți cum ar fi reacții biochimice, compoziție chimică, structuri celulare, caracteristici genetice şi caracteristici imunologice sunt utilizate în

definirea unei specii bacteriene. Identificarea unei specii şi determinarea limitelor acesteia reprezintă cele mai provocatoare aspecte ale clasificărilor biologice pentru orice tip de organism.

O modalitate oficială de identificare a speciilor bacteriene este utilizarea unei chei dihotomice de ghidare a selecției testelor utilizate în determinarea proprietăților bacteriene relevante la identificarea bacteriilor.

Regnurile - De-a lungul timpului clasificarea lumii vii a iscat multe controverse, iar sistematizarea actuală în cinci regnuri este rezultatul a numeroase studii bazate pe tehnicile şi metodele biologice disponibile la un moment dat. Sistemul aristotelian împărțea lumea vie în două – plante şi animale – pe baza capacității lor de deplasare, pe mecanismul de hrănire şi modul de dezvoltare. În acea perioadă nu erau cunoscute organismele microscopice. Acest sistem grupa procariotele, algele şi fungii cu plantele şi protozoarele mobile cu animalele. Odată cu dezvoltarea tehnicilor şi echipamentelor de laborator s-a observat că există destul de multe diferențe între celula eucariotă şi cea procariotă, ceea ce a impus regândirea modului de clasificare a acestora.

În 1735 naturalistul suedez Carolus Linnaeus grupează organismele strâns înrudite şi introduce clasificarea modernă a grupurilor: regn, încrengătură, clasă, ordin, familie, gen şi specie, şi dă caracter formal sistemului binominal de numire a organismelor. La acea vreme organismele unicelulare erau cunoscute, dar încă neclasificate. În 1866 biologul german Ernst Haeckel, propune introducerea unui al treilea regn – Protista – care să cuprindă toate organismele unicelulare, precum şi unele organisme simple pluricelulare, cum ar fi iarba de mare. Bacteriile, la care lipseşte nucleul, au fost introduse într-un grup separat în cadrul regnului Protista, denumit Monera. În 1938 biologul american Herbert Copeland propune crearea celui de al patrulea regn – Monera – care includea numai bacterii. Prin aceasta se realiza pentru prima dată separarea la nivel de regn a organsimelor anucleate (procariotele) de organismele nucleate (eucariotele). În 1957 un alt biolog american, Robert H. Wittaker, propune crearea celui de al cincilea regn care să separe fungii de celelalte organisme vii pe baza structurii lor unice şi a modului de obținere a hranei. Fungii nu ingeră hrana aşa cum fac animalele şi nici nu-şi produc propria hrană aşa cum fac plantele, aceştia secretă extracelular enzimele de digestie în sursa lor de hrană şi după aceea absorb necesarul nutritiv intracelular.

Astfel, prin sistemul celor cinci regnuri de clasificare a lumii vii sunt luate în considerare atât de organizarea celulară cât şi de modul lor de hrănire:

- Plantae (plantele)
- Fungi (fungii)
- Animalia (animalele)
- Protista (eucariotele unicelulare)
- Monera (procariotele)

Regnul Monera: Organismele pot fi împărțite în trei categorii (fără a lua în discuție un anumit taxon): eubacteria, cyanobacteria şi archaeobacteria. Această împărțire se bazează mai de grabă pe caracteristicile fenotipice, decât pe cele evoluționiste. Astfel, o cianobacterie este o eubacterie şi niciodată nu este o archaeobacterie. Eubacterile sunt bacteriile cu care ne întâlnim în viața de zi cu zi, unele din acestea producând îmbolnăviri, iar în ele îşi au originea mitocondriile. Cianobacteriile sunt eubacterii capabile de fotosinteză şi taxonul din care îşi au originea cloroplastele, iar archaeobacterile se remarcă prin adaptarea lor la condiții de mediu extreme (foarte salin, foarte fierbinte, foarte acid), deşi nu toate archaeobacteriile trăiesc în condiții extreme.

Regnul Protista: La fel ca şi în regnul Monera, acest regn este format majoritar din organisme unicelulare, totuşi trebuie reținut că, regnul Monera înglobează numai organisme procariote, în timp ce regnul Protista organisme eucariote. Acest regn reuneşte organisme din cele mai diverse, uni- sau pluricelulare, fiind taxonul în care sunt introduse toate speciile ce nu pot fi clasificate taxonomic ca fungi, animale sau plante (taxon parafiletic). În plus majoritatea protistelor sunt mai mult sau mai puțin acvatice.

Regnul Fungi: Spre deosebire de protiste, fungii eucarioți sunt organisme neacvatice, ce-şi absorb nutrienții din mediu. Tot aici sunt incluşi şi fungii unicelulari cunoscuți sub numele de drojdii.

Domeniile – În 1990 biologul american Carl Woese propune o nouă categorie taxonomică – Domeniul – bazată pe datele obținute în urma analizei acizilor nucleici. Analiza acizilor nucleici pune în evidență mult mai precis legăturile evoluționiste şi gradul de înrudire dintre organisme. Domeniul este o categorie taxonomică care, în funcție de punctul de referință, se află imediat înaintea regnului (reuneşte regnurile) sau precede regnul - supraregn. Cele trei grupe ale taxonului domenii sunt: eucariotele (domeniul Eukarya), eubacterile (domeniul Bacteria) şi archaebacterile (domeniul Archaea). Un al patrulea domeniu sau like-domeniu, denumit Urkaryote, reuneşte eubacteriile anterior realizării

endosimbiozei cu eubacteriile (exemplu: mitocondriile).

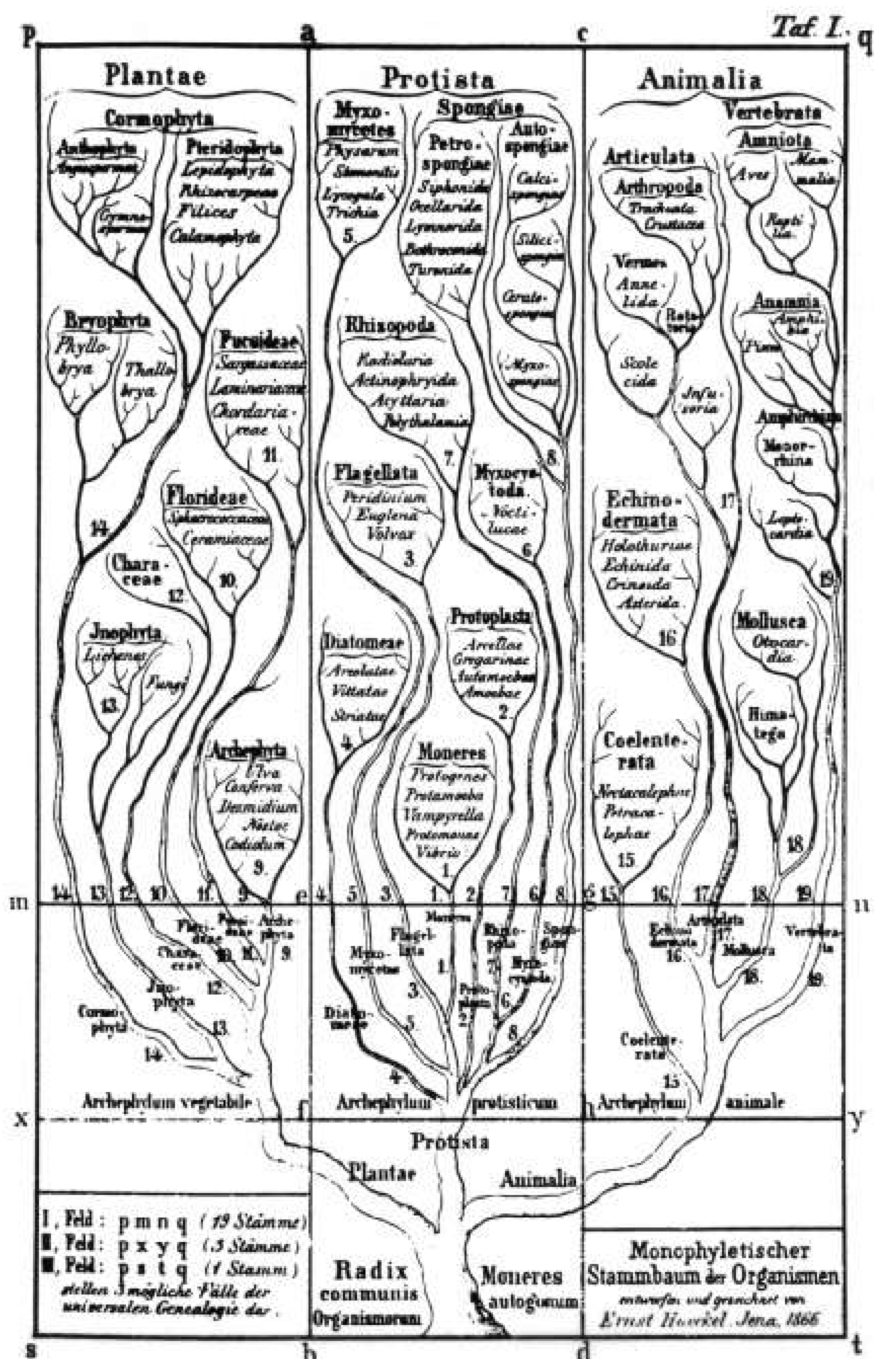


Fig 2.1. Clasificarea lumii vii în concepția lui Haeckel (1866). Aici toate

microorganismele sunt în Protista şi printre primele ramuri sunt observate grupuri microbiene încă recunoscute astăzi (bacteii, alge, protozoare).

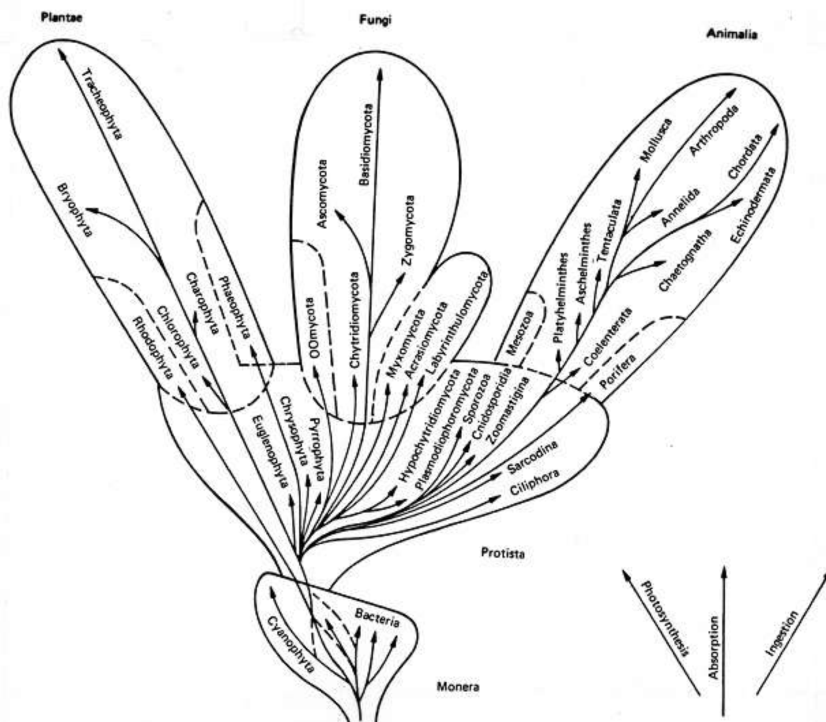


Fig. 2.2. Arborele filogenetic al lui Whittaker (1967). Sistemul celor 5 regnuri se bazează pe cele trei nivele de organizare: procariot (Monera), eucariot unicelular (Protista) şi eucariot multicelular (Plantae, Fungi şi Animalia).

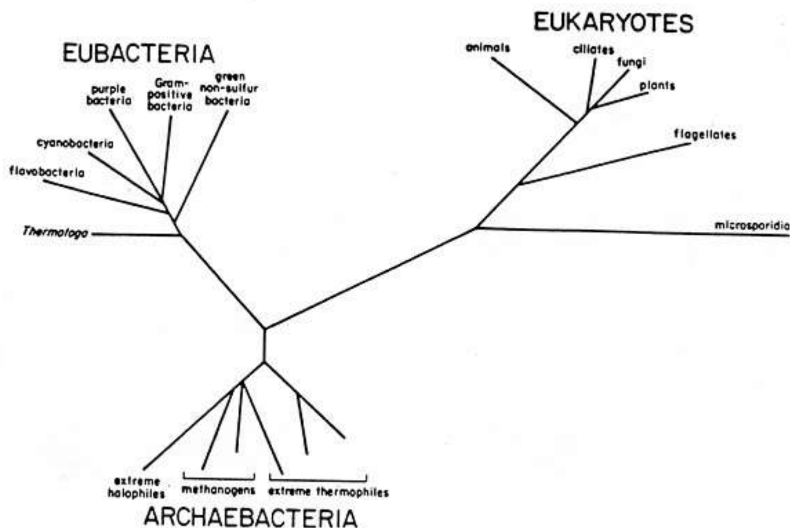


Fig. 2.3. Arborele filogenetic „universal” al lui Carl Woese (1988)

determinat prin compararea ARN ribozomal.

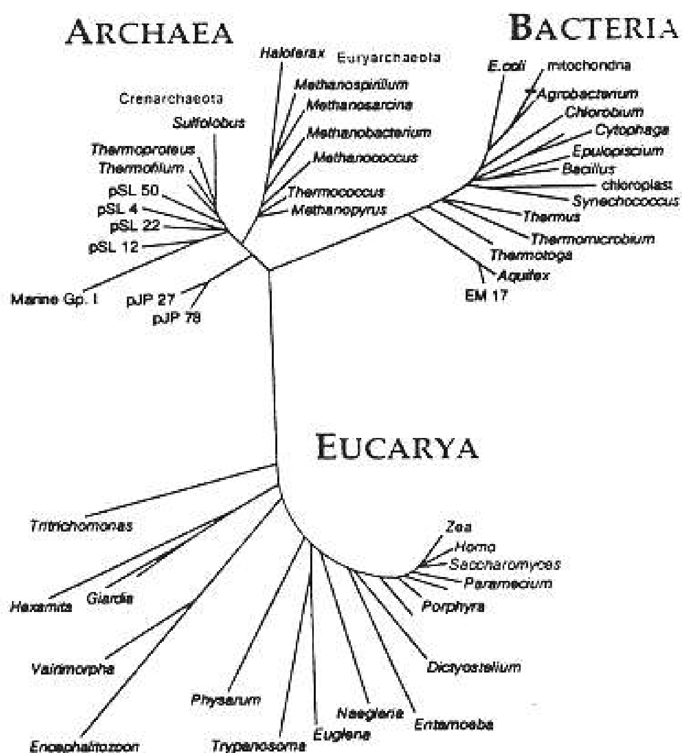


Fig. 2.4. Arborele universal al vieții derivate din secvențializarea ARN-ului subunităților ribozomale mici. Cele trei domenii majore ale organismelor vii sunt *Archaea, Bacteria* şi *Eucarya*. Între două organisme „distanța evoluției” este proporțională cu distanță măsurabilă dintre capătul terminal al unei ramuri, la un nod şi de aici la capătul terminal al ramurii față de care se face compararea. De exemplu, E.coli este mult mai înrudit cu *Agrobacterium* decât cu *Bacillus.*

Clasificarea virusurilor

Clasificarea virusurilor nu a cunoscut o dezvoltare similară cu cea descrisă la organismele celulare. La acest moment virusurile tind a fi clasificate pe baza caracteristicilor chimice, morfologice şi fiziologice:

- genom: ARN versus ARN;
- particula virionică: anvelopată versus neanvelopată;
- numeroase detalii ale ciclului de infecție intracelulară.

În denumirea virusurilor nu se utilizează sistemul binominal, acestea au nume proprii. Întrucât limba oficială a Comitetului Internațional

de Taxonomie Virală este engleza, tot mai mulți virusologi renunță la traducerea numelui virusurilor – numele proprii nu se traduc - referirea la un anume virus făcându-se, fie prin utilizarea integrală a numelui englezesc, fie a inițialelor numelui acestuia (exemplu: Bovine Leukaemia Virus sau BLV).

Taxonomia cifrică

Studiază legăturile dintre taxoni. Taxonomia numerică sau cifrică se bazează pe faptul că odată cu creşterea numărului de caracteristici observate la organisme creşte şi precizia identificării asemănărilor şi respectiv a deosebirilor dintre acestea. Dacă aceste caracteristici sunt determinate genetic atunci, cu cât organismele prezintă mai multe caracteristici comune, cu atât acestea sunt mai strâns înrudite filogenetic. În esență taxonomia numerică reprezintă evaluarea cifrică a asemănărilor dintre entitățile sau unitățile taxonomice şi ordonarea acestor unități într-un taxon pe baza înrudirii acestora.

Omologia genetică

Prin omologie se înțelege corespondența de structură a unuia sau a mai multor organe la două specii diferite, datorită originii lor comune. Analogia ADN-ului (ARN-ului) a două sau mai multe organisme poate fi realizată printr-o serie de mijloace cum ar fi determinarea compoziției în baze nucleotidice, secvența nucleotidică sau rata de hibridizare. Aceste metode sunt foarte precise în stabilirea poziției organismelor izolate, putându-se determina cu certitudine dacă acestea fac parte din specii diferite (organisme distincte) şi cât de înrudite sunt filogenetic (cu cât genotipurile sunt mai omoloage cu atât organismele sunt mai înrudite pe scara evolutivă). Dezavantajul utilizării omologiei genetice în taxonomie este dat de prețul de cost ridicat al unui asemenea laborator, dar acesta poate fi suplinit de precizie. Prin omologia genetică se stabilesc legăturile evolutive fără influența fenotipului organismelor.

Compoziția în baze nucleotidice

Conform legii lui Chargaff în ADN adenina şi timina sunt tot timpul prezente în proporții egale. Această regulă este valabilă şi pentru citozină-guanină. Totuşi nu se precizează nimic despre raportul relativ al A-T la G-C. De fapt, acesta variază de la o specie la alta şi cu cât speciile sunt mai strâns înrudite cu atât rapoartele A-T:G-C au valori mai apropiate.

Secvențializarea ADN şi ARN

Prin determinarea secvenței de baze nucleotidice sunt achiziționate

informații genotipice precise, fiind furnizate date noi necesare în stabilirea relațiilor evolutive. Totuşi, la fel ca orice altă tehnică a biologiei moleculare, determinarea secvenței ADN sau ARN necesită timp şi costuri mari. ARN-ul este adesea secvențializat prin convertirea lui într-o moleculă ADN sau prin secvențializarea genei ADN utilizată ca matriță pentru ARN.

Hibridizarea ADN

Această tehnică recurge la proprietatea ADN-ului de a-şi cliva cele două lanțuri nucleotidice la căldură, prin ruperea punților de hidrogen. Lăsând soluția de ADN să se răcească acesta-şi va reface (realinia) dublu-helixul. Dacă ADN-ul ce provine de la două organisme diferite este pus împreună şi supus unui asemenea tratament, realinierea obținută la final va fi influențată de nivelul omologiei celor două secvențe ADN (cu cât similitudinea lor este mai exactă, cu atât sunt mai mult aliniate). Refacerea helixului este dependentă de gradul de înrudire pe scara evolutivă a celor două organisme.

Identificarea tulpinilor

Uzual organismele strâns înrudite, cum ar fi membrii aceleiaşi specii, sunt foarte asemănătoare şi de aceea au fost necesare metode suplimentare, capabile să le diferențieze pe baza anumitor elemente de detaliu. Aceste metode sunt: determinarea profilului proteic, imunodiagnosticul şi tipizarea fagică. Prin aceste metode se compară fenotipurile, motiv pentru care nu constituie instrumente de identificare a relațiilor evoluționiste, ele nefiind la fel de precise ca homologia genetică.

Determinarea profilului proteic

Identificarea proteinelor (în sensul stabilirii mărimii şi cantității fiecăreia) poate construi patternul reproductibil tipic al unui organism dat. Organsimele care se aseamănă foarte mult expun profile proteice aproape identice.

Imunodiagnosticul

Abilitatea anticorpilor de a se cupla şi/sau inactiva microorganismele poate fi exploatată în determinarea legăturilor evoluționiste. Două organisme care se pot cupla cu acelaşi anticorp sunt considerate mai înrudite comparativ cu un al treilea, care nu se cuplează specific cu acest anticorp.

Tipizarea fagică

Bacteriofagii, la fel ca anticorpii, pentru a putea infecta o anumită

celulă bacteriană trebuie să se cupleze cu aceasta. Fagii nu sunt capabili să infecteze unele celule înaintea adsorbției lor datorită existenței unor endonucleaze de restricție care previn replicarea acestora. Unele tulpini microbiene care posedă receptori de suprafață diferiți, sisteme de restricție sau profagi vor favoriza creşterea unor tipuri diferite de fagi. Exploatând această specificitate a patternului este posibilă utilizarea tipizării fagice în diferențierea tulpinilor.

Alte metode de diferențiere a microorganismelor

Anumiți membrii ai genului Eubacteria sunt identificați frecvent prin apelarea la metode de colorare speciale şi variate teste biochimice. Acestea sunt metodele uzuale de lucru practicate în laboratoarele de microbiologie.

Tulpina tip

În clasificarea microoranismelor de un real ajutor sunt tulpinile microbiene standard (tulpina tip) față de care se analizează microorganismul izolat. Adesea tulpina tip este primul exemplar al unei specii sau tulpini. Speciile tip sunt păstrate în colecții sau bănci microbiene naționale şi în laboratoare de referință naționale şi internaționale.

Manualul Bergey

Metodele de identificare şi diferențiere a bacteriilor sunt reunite în „*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*". La utilizarea acestui manual se bacteriile nu sunt prezentate de o manieră care să reflecte interrelațiile lor evolutive. Acesta grupează bacteriile într-o manieră mult mai practică în identificarea lor. La acest moment lumea științifică nu dispune de suficiente informații pentru a schița un arbore genealogic complet pentru bacterii.

În ultimele două decade au avut loc multe modificări în clasificarea sau taxonomia bacteriilor. Mulți dintre aceşti noi taxoni sunt rezultatul apelării la metodele geneticii moleculare cu sau fără asociere cu cele tradiționale:

1. Omologia ADN-ului şi mol% G+C din ADN;
2. Asemănări de secvențe între 23S, 16S şi 5S ARNr;
3. Catalogarea oligonucleotidelor;
4. Analiza taxonomică numerică a proteinelor solubile totale sau a unui set de caractere morfologice şi biochimice;
5. Analiza peretelui celular;
6. Profilul serologic;
7. Profiluri de acizi graşi celulari.

Prima bacterie cu genomul secvențializat complet a fost *Haemophilus influenzae* (Fleischmann, R. D. şi col., 2005). Interesul pentru genomul procariotelor este din ce în ce mai mare şi obiectivul major în determinarea secvenței genomice complete a unui organism este înțelegerea mai bună a biologiei şi evoluției microbilor (Chan V.L., 2006).

Deşi unele metode sunt folosite de mult timp (exemplu: analiza peretelui celular, profilul serologic) altele au început să fie folosite pe scară largă abia după după 1980 (exemplu: analiza ARNr-ului). Cele mai folosite instrumente în taxonomia bacteriană vor fi prezentate în continuare.

Analiza ARN-ului ribozomal

Prin analiza acidului ribonucleic din ribozomi este posibilă obținerea de informații ce pot fi utilizate în taxonomie, datele colectate putând fi utilizate la identificarea asemănărilor secvențelor ARN cercetate şi la realizarea unor cataloage sau liste nucleotidice. Ribozomii au fost descrişi pentru prima dată de George Emil Palade, laureat al Premiul Nobel pentru această descoperire. Denumite initial „granulele lui Palade”, aceste organite au fost numite ribozomi de catre Richard B. Roberts in 1958. Din punct de vedere structural aceste organite sunt constituite din ARN ribozomal şi proteine ribozomale (ribonucleoproteine). Ribozomul procariot este o unitate de 70S (Svedberg, unitate de sedimentare) compusă din două subunități funcționale separate: 50S şi 30S. Subunitatea 50S este formată dintr-o moleculă ARN 5S cu 120 nucleotide, o molecula ARN 23S de 2900 nucleotide şi 34 de proteine ribosomale, iar subunitatea 30S este formată dintr-o moleculă ARN 16S de 1540 nucleotide si 21 proteine.

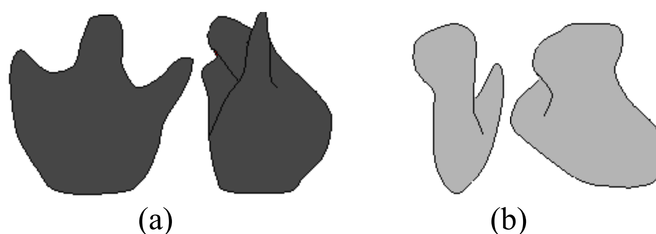


Fig 2.5. Ribozomul. Vedere din față şi lateral a subunității mari de 50S(a) şi a subunității mici de 30S (b).

Subunitatea 16S se conservă foarte bine în timp, motiv pentru care este considerată un excelent cronometru peste timp al bacteriilor (Woese, CR. 1987). Prin utilizarea revers-transcriptazei ARNr 16S poate fi secvențializat cu obținerea unor lanțuri lungi ce poate acoperi 95% din secvența oligonucleotidică totală, permițându-se astfel determinarea

precisă a unei relaţii filogenetice (Lane, DJ. şi col 1985). O alternativă a secvenţializării ARNr 16S este aceea a amplificării prealabile a unor regiuni specifice prin reacţia de polimerizare în lanţ (PCR). Pentru secvenţializarea ARNr 16S se realizează o copie ADN monocatenar cu ajutorul reverstranscriptazei având ARN-ul ca matriţă. Fragmentele ADN rezultate pot fi secvenţializate prin metoda Sanger şi astfel poate fi dedusă secvenţa oligonucleotidică a matriţei ARNr 16S. Cu ajutorul unor asemenea studii de secvenţializare a ARNr 16S, echipa de cercetători condusă de Woese a propus împărţirea lumi vii în cele trei domenii: Eukariotes, Archaebacteria şi Prokaryotes. Ultima include cianobacteriile şi eubacteriile, acestea din urmă fiind importante pentru alimente. Similitudinea secvenţelor de ARN 16S este larg folosită, iar unii taxoni transmisibili prin alimente au fost creaţi pe baza datelor obţinute prin această tehnică. La acest moment se consideră că prin intermediul secvenţializării ARNr 23S va fi posibilă obţinerea de noi informaţii în taxonomia bacteriană. (Jay, J. M., 2005). De asemenea există biblioteci de secvenţe ARNr 5S eubacterial, dar sunt mult mai mici decât cele pentru 16S.

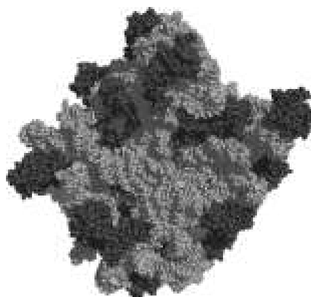


Fig. 2.6. Structura atomica a subunitaţii ribozomale 50S

Pentru un număr de organisme au fost puse la punct o serie de cataloage nucleotidice ARNr 16S, şi există deja biblioteci mari ce conţin aceste date. Prin această metodă, ARNr 16S este supus digestiei cu ribonuclează T1, care clivează molecula la nivelul reziduurilor guaninice (G). Astfel sunt obţinute secvenţe de 6-20 baze, iar similaritatea lor poate fi comparată cu ajutorul coeficientului Dice (S_{AB}). Deşi relaţia dintre S_{AB} şi asemănarea procentuală nu este bună la valori ale S_{AB} mai mici de 0,40, informaţia ce se obţine îşi găseşte utilitatea mai ales la nivel de familie. Este preferată catalogarea oligonucleotidelor prin secvenţializarea ARNr 16S cu reverstranscriptază atâta timp cât pot fi secvenţializate fragmente mari din ARNr.

Analiza ADN-ului

Conținutul mol procentual în G+C al ADN-ului bacterian a fost utilizat timp de mai multe decenii în taxonomia bacteriană, iar prin coroborarea acestor date cu cele furnizate de secvențializarea ARNr 16S şi ARNr 5S are loc o creştere semnificativă a valorii acesteia. Prin analiza ARN-ului ribozomal 16S, bacteriile Gram-pozitive se împart în doua grupe la nivel de familie: un grup cu mol% G + C >55 şi un grup cu mol% G + C <50 (Woese, CR. 1987). Din primul grup fac parte genuri ca *Propionibacterium, Streptomyces, Corynebacterium, Micrococcus, Bifidobacterium sau Brevibacterium*, iar din al doilea grup genuri ca *Listeria, Bacillus, Staphylococcus, Pediococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Erysipelothrix* sau *Clostridium*. Când continutul în G+C al două organisme diferă cu mai mult de 10%, acestea au puține secvențe de baze comune. Hibridizările ADN–ADN sau ADN–ARN au fost utilizate o perioadă de timp şi continuă să fie extrem de valoroase în sistematizarea bacteriană. S-a constatat că sistemul de referință ideal pentru taxonomia bacteriană este secvențializarea completă a ADN-ului unui organism (Wayne, L.G. şi col. 1987). Este general acceptat faptul că specia bacteriană poate fi definită filogenetic, prin intermediul hibridizarii ADN–ADN, în care o similitudine de 70% sau mai mare şi un punct de topire (T_m) de 5ºC sau mai mic defineşte o specie (Wayne, L.G. şi col. 1987). Deşi prin cele prezentate până acum o definire filogenetică satisfăcătoare a unui gen bacterian nu este posibilă, utilizarea pe mai departe a tehnicilor acizilor nucleici în conjuncție cu metodele mai sus amintite ar trebui să ducă la o sistematizare bacteriană bazată pe sistemul filogenetic. Între timp sunt aşteptate modificări ale poziției taxonilor (Lane, DJ. şi col 1985).

Pe lângă hibridizarea ADN şi studiile pe ARNr 16S, mai sunt recomandate şi alte teste genotipice pentru evaluarea bacteriilor izolate în vederea cunoaşterii genului şi speciei. Dintre acestea amintim electroforeza în gel în câmp pulsatoriu (PFGE – Pulsed Field gel electrophoresis), amplificarea randomizată a ADN-ului polimorfic (RAPD – Randomly Amplyfied Polymorphic DNA) şi determinarea elementelor genetice extracromozomiale.

Capitolul 3
Structura celulei procariote

Istoria evoluției bacteriilor a început cu aproximativ 3,5 miliarde de ani în urmă continuând şi în prezent. Faptul că aceste microorganisme unicelulare, simple au rezistat un timp atât de îndelungat într-o diversitate de habitate arată că structura şi funcțiile lor sunt uimitor de adaptabile. Celula bacteriană apare de o simplitate înşelătoare, dacă este examinată la microscopul obişnuit. Celulele procariote sunt cele mai simple celule, dar dacă sunt examinate la microscopul electronic sau investigate prin studii biochimice, complexitatea lor funcțională devine evidentă. Fac parte din microorganismele cele mai obişnuite şi mai ubicvitare de pe pământ, având rol esențial în echilibrul naturii precum şi în viața animalelor şi a omului.

Cunoaşterea structurii şi a comportamentului celulelor procariote este fundamentală pentru studiile ulterioare privind: genetica, controlul alimentelor, bolile infecțioase şi terapia medicamentoasă. Problemele principale tratate în acest capitol sunt elemente de anatomie şi ultrastructura celulei bacteriene, de fiziologie, de multiplicare, de comportare față de factorii de mediu precum şi de ecologie şi microbiologie alimentară.

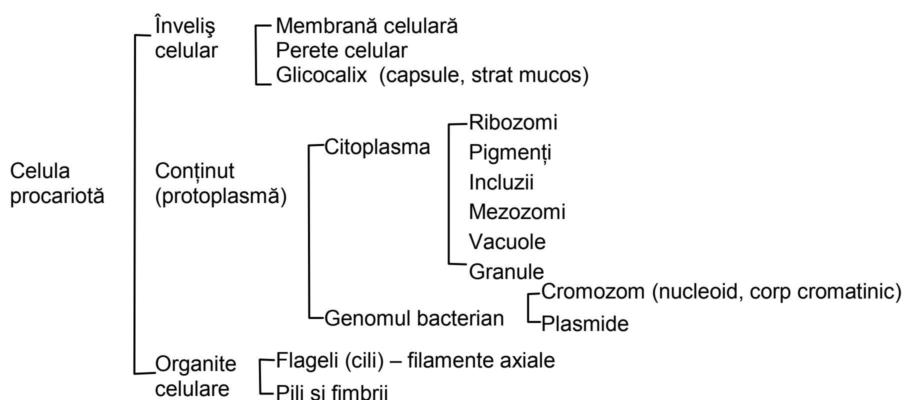
Înainte de a ne ocupa mai îndeaproape de anatomia celulei bacteriene, trebuie menționat faptul că multe din cunoştințele privind detaliile descrise rezultă din studii electronomicroscopice şi nicidecum din experiențe directe de laborator. Deşi microfotografiile structurilor celulare au un aspect plan, trebuie reținut faptul că acestea există într-o configurație tridimensională. Detaliile de structură ale celulei bacteriene se referă la eubacterii. Pentru stabilirea principalelor caracteristici anatomice ale celulei procariote vom efectua în continuare o disecție microscopică, urmând un traseu ce începe de la structurile celulare externe şi merge spre conținut.

3.1. Organitele celulare
(structuri pentru deplasare şi pentru aderare)

Pe suprafața unor specii bacteriene se găsesc mai multe tipuri distincte de structuri accesorii. Aceste molecule alungite au fost denumite *anexe,* care deşi sunt comune mai multor specii bacteriene, nu sunt prezente la toate speciile.

Anexele au fost clasificate în două subgrupe principale: flageli şi filamente axiale (care conferă mobilitate) şi fimbrii şi pili (care asigură aderența).

Schema 3.1. Analiza structurii celulei procariote



3.1.1. Flagelii (cilii)

Flagelii procariotelor reprezintă o anexă cu o structură cu adevărat uimitoare, unică în lumea biologică. Funcția principală a flagelilor constă în a conferi mobilitate celulei bacteriene şi nu autopropulsie, respectiv capacitatea unei celule de a înota liber, într-un habitat apos.

Flagelii pot fi definiți ca formațiuni cilindrice, fine, lungi şi subțiri, situați pe suprafața celulei bacteriene. Celulele eucariote pot prezenta şi ele flageli (care în mod obişnuit se numesc cili), însă cu o structură mult mai complexă, caracteristică. Tocmai din acest motiv vom prefera să folosim în acest text denumirea de flageli pentru bacterii.

Se presupune că cilogeneza s-a dezvoltat o dată cu alungirea celulei fiind prezentă la bacili (50%), vibrioni, spirili şi numai excepțional la bacteriile sferice (de exemplu: *Sporosarcina ureae*).

Datorită faptului că un flagel bacterian prezintă o finețe extremă, este necesar un grad înalt de mărire pentru evidențierea arhitecturii sale speciale. Flagelii sunt alcătuiți din trei structuri speciale: corpul bazal, articulația (cârligul sau teaca) şi filamentul helical extracelular (flagelul propriu-zis).

Filamentul flagelului are o structură helicoidală compusă din cel puțin unsprezece tipuri de polipeptide cu aproximativ douăzeci de nanometri în diametru, variază între unu şi şaptezeci microni în lungime, se inseră în cârlig (teacă) care la rândul său se fixează de celulă prin corpusculul bazal alcătuit dintr-o serie de inele fixate solid în peretele celular, spațiul periplasmic şi membrana celulară.

Proteina majoră care intră în structura flagelilor se numeşte flagelină, fiind asemănătoare miozinei sau proteinelor contractile. În stare monomeră aceasta are forma unei particule sferice cu diametrul de 4,6 nanometri, greutatea moleculară de 40.000 daltoni şi o compoziţie în aminoacizi variabilă de la o specie la alta. Cârligul şi corpul bazal sunt alcătuite din aproximativ nouă proteine diferite de proteina flagelului propriu-zis. Creşterea flagelului se face întotdeauna la vârf şi nu la bază (ca la firul de păr). Flagelina (aparatul de locomoţie al flagelului) este sintetizată în celulă şi difuzează în canalul central al flagelului fie activ, fie pasiv (după un gradient de concentraţie) până la capătul distal (liber) al acestuia unde se dispune simetric. Sinteza flagelinei, se realizează printr-un proces de autoasamblare (selfasamblare), toate informaţiile necesare aflându-se în structura subunităţilor proteice ale acestuia.

Flagelina asigură creşterea flagelului bacterian cu o viteză de aproximativ 0,15 nm/minut la temperatura de 37ºC.

Îndepărtarea mecanică a flagelilor duce la refacerea spontană a acestora ca număr şi lungime (caracteristice speciei) în aproximativ o generaţie. Creşterea flagelilor, reprezintă un proces mai mult sau mai puţin continuu ce se realizează până în momentul atingerii lungimii optime a speciei bacteriene respective. În momentul diviziunii celulare, noul flagel se formează la nivelul septului de diviziune astfel încât celulele fiice apar echipate complet din acest punct de vedere. Flagelina prezintă proprietăţi antigenice, reprezentând la bacteriile flagelate antigenul H (hauch = văl, membrană). La bacteriile peritrihe se presupune că flagelii sunt distribuiţi în timpul diviziunii celulare între cele două celule fiice în mod egal, urmând ca după aceea să fie sintetizaţi restul acestora, în locurile libere.

Cârligul, tubular curbat este fixat de celulă prin corpusculul bazal, compus dintr-o serie de inele fixate solid în peretele celular, spaţiul periplasmic şi membrana celulară. Mecanismul cârlig (articulaţie), corpuscul bazal se aseamănă foarte mult cu mişcarea unei mingii aruncate la coş. Acest aranjament permite cârligului să realizeze împreună cu filamentul său o rotaţie de 360^{o} executând o mişcare de rotaţie şi înainte ca o lovitură de bici. Prin rotirea flagelului într-o anumită direcţie, corpul celular se roteşte în direcţie opusă, iar acest lucru îi conferă o mişcare înainte.

Corpusculul bazal reprezintă partea cea mai importantă, servind ca articulaţie flexibilă universală. La bacteriile Gram pozitive (de exemplu: *Bacillus subtilis*) corpul bazal e format din două discuri notate cu *S* şi *M,* iar la cele Gram negative (de exemplu: *Escherichia coli*) din patru discuri notate cu *S, M, P* şi *L*. Discul S se află la nivelul spaţiului periplasmic, iar M se roteşte liber în membrana celulară. Discul P se află la nivelul peretelui celular (stratul de peptidoglican), iar inelul L la nivelul

lipopolizaharidelor din membrana externă.

Cuplul de forțe de torsiune care determină rotația axului ia naştere între discul M cu rol de rotor şi discul S care acționează ca stator.

În funcție de numărul şi aranjamentul (distribuția) lor pe suprafața celulei bacteriene există trei tipuri flagelare, şi anume:

- flagel cu dispoziție polară, atunci când sunt ataşați la unul sau la ambele capete ale celulei. În cadrul acestui tip pot fi descrise trei subtipuri:
  - *subtipul monotricha*, cu un singur flagel;
  - *subtipul lofotricha*, cu mici fascicule sau smocuri de flageli care ies din acelaşi loc;
  - *subtipul amfitricha*, cu flageli la ambii poli ai celulei.

Cilii polari sunt caracteristici pentru familia *Pseudomonadaceae* şi genul *Vibrio*.

- flageli cu dispoziție peritricha care sunt dispersați la întâmplare pe toată suprafața celulei. Aceştia sunt caracteristici pentru bacteriile enterice (20-30 cili), de exemplu *Proteus vulgaris*, precum şi speciile din genul *Clostridium*. În cazul majorității bacteriilor flagelate peritrich numărul cililor poate ajunge la câteva sute.
- flageli cu dispoziție subpolară care sunt implantați (în număr de 1-2) între cei doi poli. Acest tip de aranjament este caracteristic enterococilor precum şi bacteriilor din genul *Vibrio*.

Tipul flagelilor constituie deseori un criteriu de clasificare a bacteriilor mobile. În ceea ce priveşte forma cililor, aceasta este în general cilindrică însă uneori pot apărea şi turtiți ca o panglică. Diametrul variază între 12-25 nm, lungimea lor fiind în medie de 25-30 μ. La unii spirili saprofiți, lungimea cililor poate ajunge până la 72 μ.

Pentru identificarea directă a unei bacterii mobile se impune folosirea unor tehnici speciale de colorare (Leifson, Cassares Gill) sau prin microscopie electronică prin colorare negativă, deoarece flagelii sunt prea mici pentru a fi vizibili în preparate vii, necolorate la microscopul obişnuit.

Deseori este suficient să se ştie pur şi simplu dacă o specie bacteriană posedă capacitatea de mişcare (mobilitate). Un mijloc de evidențiere indirectă a mobilității constă în însămânțarea unei mase mici de celule bacteriene într-un mediu semisolid. O creştere care se răspândeşte rapid în toată suprafața mediului denotă faptul că bacteria respectivă este mobilă.

Examinarea mobilității se poate realiza şi prin examen microscopic între lamă şi lamelă sau în picătură suspendată. Dacă bacteria cercetată este mobilă aceasta va traversa câmpul microscopic dintr-o parte în cealaltă prin mişcări de înaintare sau în zig-zag, în timp ce o celulă imobilă se va

legăna pe loc şi nu se va deplasa în nici o direcţie a câmpului microscopic.

Detalii privind modul de deplasare al flagelilor. Flagelii reprezintă organite de mişcare cu ajutorul cărora bacteriile se deplasează cu o viteză de 20-80 μ/s, ceea ce echivalează cu de 70 ori lungimea corpului bacterian pe secundă (ghepardul, cel mai rapid animal, aleargă cu o viteză care nu depăşeşte de 3 ori lungimea corpului pe secundă).

Filamentul flagelului este pus în mişcare de motorul rotativ care se învârte în jurul propriului său ax, ca o elice submicroscopică, propulsând în felul acesta celula.

Bacteriile cilogene nu conțin sisteme enzimatice pentru transformarea energiei chimice în energie mecanică, la baza mişcării stând interacțiunea dintre încărcătura electrică de sens contrar de pe discurile „M" şi „S". Acest fapt determină translocația activă a ionilor de pe discul „M" generând o rotație a acestuia cu o viteză de 40-50 ture pe minut. În funcție de sensul mişcării rotatorii a discului „M" bacteriile vor realiza o mişcare de rostogolire dacă rotorul se va învârti în sensul acelor de ceasornic sau o deplasare în linie dreaptă în cazul rotației acestuia în sens antiorar. Mişcarea celulelor peritriche este diferită de cea a celulelor monoflagelate sau lofotriche.

În mod normal la *Escherichia coli* flagelii se rotesc „antiorar" (opus acelor de ceasornic), formând un fascicul în urma celulei, pe care o propulsează spre a se deplasa în linie dreaptă. Când sensul rotirii se schimbă, devenind „orar" (în sensul acelor de ceasornic) fascicolul de flageli se răsfiră, fiecare trăgând în altă direcţie, iar bacteria se rostogoleşte. Când rostogolirea s-a terminat fascicolul se reface din nou, şi celula, dirijată într-o nouă direcţie, aleasă la întâmplare, îşi reia drumul drept. Deci, rotaţia în sens „antiorar" asigură deplasarea în linie dreaptă, iar cea în sens „orar" rostogolirea.

În cazul bacteriilor cu flageli polari deplasările în linie dreaptă sunt întretăiate de scurte mişcări de recul, determinate de rotaţia în sens „orar", urmate apoi de reluarea drumului drept într-o direcţie aleatorie.

Bacteriile flagelate polar se deplasează mult mai rapid decât cele care prezintă cili pe toată suprafața celulei.

Bacteriile mobile pot executa unele acțiuni oarecum sofisticate. Ele se pot mişca spre surse potențiale de nutriție şi la distanță de condițiile de mediu adverse. Acest tip de comportament poartă numele de chimiotactism sau chimiotaxie. Chimiotactismul pozitiv este mişcarea în direcţia unui stimul chimic favorabil, spre substanțe utile metabolismului bacterian numite substanțe atractante. Acestea sunt reprezentate de zaharuri, amino-acizi, oxigen, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.

Chimiotactismul negativ este mişcarea unei celule în direcţia opusă unor substanțe potențial nocive sau a unor produşi de excreţie rezultaţi de

cele mai multe ori din suprapopularea mediului de cultură, care se numesc substanțe repelente. Dintre acestea fac parte acizii grași, alcooli, H^+, OH^-, cationii de metale grele, etc.

Adler a demonstrat că adăugarea de substanțe repelente în mediul de cultură duce la sporirea rostogolirilor, iar durata deplasărilor în linie dreaptă crește favorizând astfel apropierea de substanțe necesare metabolismului celulei bacteriene acolo unde acestea se află în concentrație mai mare.

Efectul final este acela că bacteriile se acumulează aproape de sursa de atractant și departe de repelent.

Chimiotaxia poate fi studiată ușor prin tehnica capilarității care constă în introducerea unui tub capilar (care conține un atractant, un repelent sau o soluție salină), într-un vas care conține o suspensie de bacterie mobilă. Se va observa că:

- în tubul cu atractant se produce o acumulare de bacterii care traversează pereții capilarului;
- în tubul cu repelent concentrația de bacterii va fi mai mică decât în afara acestuia;
- în cel cu soluție salină concentrația de bacterii din tub devine egală cu cea din afara lui.

Răspunsul chimiotactic al bacteriilor este condiționat de prezența unui „chemosensor" alcătuit din două componente dintre care unul recunoaște și leagă substanțele detectate numit chemoreceptor, iar celălalt semnalizează flagelului modificarea produsă în mediu, numit semnalizator.

Chemoreceptorii se găsesc în spațiul periplasmic sau se leagă lax de membrana celulară sub formă de proteine de legare. Funcțiile lor sunt acelea de a recunoaște specific anumite substanțe și de a le transporta în celula bacteriană.

Specificitatea chemoreceptorilor nu este absolută. De exemplu, chemoreceptorul (Che) pentru galactoză recunoaște în același timp glucoza și fructoza, iar Che pentru manoză recunoaște și glucoza.

Proteinele chemotaxice metil acceptoare (MCPS) numite și transductori au rolul de a lega receptorul de reglatorul rostogolirilor. Fiecare transductor interacționează cu anumiți receptori transmițând semnalele rezultate, direct la componenții sistemului de reglare. La *Escherichia coli* există patru tipuri de proteine MCP, denumite MCP I, II, III, IV.

Fiecare MCP răspunde la anumite substanțe atractante și repelente. MCPS sunt proteine transmembranare care interacționează cu atractanții sau repelenții fie direct, fie prin intermediul chemoreceptorilor. Răspunsul

chimiotactic este condiționat de prezența metioninei. Metilarea lui MCPS este produsă prin cedarea unor grupări metil de către S-adenozilmetionină (o formă activă a metioninei) care poate adăuga la fiecare moleculă MCP până la patru grupări metil.

Adăugarea unui atractant la suspensia bacteriană induce o suprimare imediată a rostogolirilor, ca răspuns la gradientul temporar, în timp ce adăugarea unui repelent induce imediat şi continuu o serie de rostogoliri. După un timp variabil (de la câteva secunde la câteva minute) bacteriile îşi reiau modul inițial de „înot” chiar dacă repelentul sau atractantul este prezent.

Cea de-a doua metodă, prin care se poate demonstra mobilitatea bacteriană şi chimiotaxia utilizează un microscop special construit pentru a soluționa această problemă care se numeşte „microscop de urmărire” („tracking microscop”). Acesta înregistrează automat drumul parcurs şi viteza de deplasare a unui individ bacterian. Se pot calcula numărul de drumuri în linie dreaptă şi numărul de rostogoliri.

Adăugarea de atractanți sau îndepărtarea repelenților cresc metilarea MCP_S, în timp ce îndepărtarea atractanților sau adăugarea de repelenți descreşte metilarea.

Carboxilarea proteinelor este intim legată de procesul de adaptare a bacteriilor la stimulii chemotaxici din mediu, reprezentând mecanismul biochimic esențial al acestei funcții.

Au fost identificate până în prezent cel puțin patru proteine plasmatice cu rol în transmiterea excitației de la MCP la flagel. Două dintre aceste proteine controlează direcția de rotație a flagelului, iar celelalte două par să interacționeze în unele cazuri cu MCP_S şi să transmită excitația proteinelor flagelare de control de la nivelul corpusculului bazal. Studiul unor mutante bacteriene arată că proteinele implicate în controlul flagelilor pot fi alternativ fosforilate şi defosforilate, iar aceste procese afectează funcția lor de control.

Modelul excitației flagelare arată că interacțiunile dintre proteinele citoplasmatice sunt atribuite CheA cu MCP metilat în unele cazuri cauzând fosforilarea CheA. După aceea CheA transferă fosfatul spre o a doua proteină CheY care este capabilă să producă rotația flagelului în sensul acelor de ceasornic, determinând rostogolirea bacteriei.

Când MCP este demetilată, CheA şi CheY sunt defosforilate, iar flagelul este rotit invers acelor de ceasornic rezultând deplasarea în linie dreaptă.

Au mai fost identificate şi alte proteine de control însă funcțiile lor nu sunt pe deplin cunoscute.

Celulele bacteriene prezintă pe suprafața lor un număr foarte mare de receptori diferiți, cei mai mulți foarte specifici având afinitate mare

pentru una sau două substanțe şi alții cu afinitate mai slabă. De exemplu, la *Escherichia coli* au fost identificați aproximativ 30 de receptori dintre care 18 pentru atractanți şi 12 pentru repelenți.

Capacitatea bacteriilor de a răspunde la acțiunea diferitelor substanțe chimice depinde de setul de receptori cu specificități diferite de pe suprafața lor.

Cele mai rapide bacterii sunt cele cu flageli polari ca *Thiospirillum* care atinge 5,2 mm/minut şi *Pseudomonas aeruginosa* care înoată cu 3,4 mm/minut. Bacteriile flagelate peritrich sunt mult mai încete. De exemplu, *Escherichia coli* înaintează cu 1 mm/minut, iar *Sporosarcina ureae* cu 1,7mm/minut.

3.1.2. Filamentele axiale

Bacteriile în formă de tirbuşon, numite spirochete, prezintă un mod de locomoție neobişnuit, ondulator, provocat de două sau mai multe fire lungi, răsucite numite filamente sau fibre axiale.

Un flagel axial este un tip de flagel modificat constituit dintr-o microfibrilă lungă, subțire inserată într-un cârlig. Spre deosebire însă de flageli, întreaga structură este inclusă în spațiul periplasmic dintre peretele şi membrana celulară, şi de aceea i s-a dat şi denumirea de endoflagel. Filamentele se încolăcesc strâns în jurul spirelor şi se rotesc liber conferind celulei o mişcare sinuoasă sau flexuoasă. Această formă de locomoție trebuie examinată pe celulele vii pentru a fi corect apreciată.

3.1.3. Anexe non-locomotorii

Pilii şi fimbriile. De obicei, termenii de pili sau fimbrii erau folosiți alternativ pentru a indica orice anexă a suprafețelor bacteriene neimplicată în mobilitate. Deoarece este utilă diferențierea celor doi termeni se foloseşte noțiunea de fimbrie pentru a desemna formele mai scurte şi numeroase şi de pil pentru anexe mai lungi şi răzlețe.

Fimbriile sunt apendice filamentoase, asemănătoare unor țepi (fimbria – franjuri, fibre), aparent rigide, dispuse pericelular polar sau bipolar, nefiind implicate în transferul ADN cromozomal, viral sau plasmidic. Sunt prezente mai ales la bacteriile izolate din mediile naturale. Numărul fimbriilor pe celulă variază între 1-1000, iar sinteza lor este controlată de gene cromozomale.

Pe baza criteriilor morfologice şi funcționale, Brinton le-a grupat în cinci tipuri notate cu cifre romane de la I la V.

Prezintă o structură tubulară cu diametrul între 3 şi 14 nm şi lungimea între 1 şi 20 μm, alcătuite din molecule de fimbrilină, cu

greutatea moleculară de 16,6 kDa, formate din 163 de resturi de aminoacizi asamblate după o simetrie helicală.

Ca şi la pili, originea lor este intracelulară pentru că rămân legate de protoplaşti şi sferoplaşti după îndepărtarea peretelui celular al bacteriei.

Fimbriile prezintă o tendință inerentă de a adera unele la altele şi la suprafețe, fiind deseori agregate dense de celule pe suprafața unor lichide, cât şi la colonizarea microbiană a unor suprafețe neanimate (inerte), ca roca şi sticla. Unii agenți patogeni pot coloniza şi infecta țesutul gazdă ca urmare a aderenței etanşe între fimbriile lor şi celulele invadate.

Prezența lor favorizează fixarea bacteriilor de celule şi țesuturi împiedicând „spălarea" acestora de către lichidele organismului şi aderarea la nivelul țesuturilor pentru care prezintă tropism. De exemplu, *Streptococcus pyogenes* izolat din gât aderă la țesutul faringian, *Escherichia coli* se implantează perfect în celulele intestinale, iar gonococul invadează țesutul genito-urinar. În acelaşi timp, fimbriile conferă bacteriilor patogene mai multă virulență, asigurându-le rezistență la fagocitoză.

La nivelul celulei bacteriene fimbriile asigură creşterea suprafeței active în absorbția de substanțe nutritive şi pot servi ca organite de transport ale unor metaboliți.

Pilii (numiți şi **„pilii de sex"**). Pilii sunt apendici filamentoşi pericelulari ai bacteriilor Gram negative, care prezintă calea efectivă de transfer a cromozomului bacterian prin fenomenul de conjugare şi acționează ca receptori specifici de fag.

Pilii de sex sunt în număr de 1 până la 10 pe celulă fiind determinați de gene extracromozomale. Sunt prezenți pe suprafața celulelor (F^+, Hfr şi F') la *Escherichia coli* K12*, Salmonella typhimurium, Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri, Caulobacter* (Ottow).

Lungimea pililor poate ajunge până la 20 de microni, având un diametru mai mare decât al fimbriilor (6-15 nm). Mecanismul de creştere este acelaşi cu cel al fimbriilor, numai că au capacitatea să ajungă la lungimea maximă în 1-5 minute.

Pilii de sex sunt de două tipuri şi anume: „F" şi „I".

- Pilii „F" sunt sintetizați de o plasmidă de sex „F". Prezintă o structură tubulară, având un canal axial cu diametrul de 2,5-3 nanometri, care este delimitat de un perete format din molecule de pilină (fosfoglicoproteină cu greutatea moleculară de 11800 dal) dispuse helical.
- Pilii „I" sunt sintetizați de unii factori „col" de tip special, cu rol de conjugon. Ei prezintă o structură compactă fără canal axial.

Extremitatea liberă a unor pili prezintă un buton terminal ce poate avea forme diferite: de disc, de cupă sau caliciu, sferică (veziculară), compactă sau cu structură laminară.

Până în prezent pili adevăraţi s-au găsit numai la bacteriile Gram negative unde ei sunt implicaţi, în special în procesul de conjugare. Conjugarea reprezintă transferul de material genetic de la o bacterie donatoare la o bacterie receptoare, proces realizat prin intermediul unei legături intercelulare directe şi condiţionat de prezenţa în celula donatoare a unui element cu funcţie de plasmidă de sex sau conjugon (plasmidă „F", „R" şi „col").

Fenomenul de conjugare are loc de obicei între genuri şi specii foarte apropiate. Celulele opuse ca sexualitate (♂ şi ♀) formează, după o serie de ciocniri întâmplătoare, perechi de încrucişare specifică.

Pilii acţionează ca o conductă („pipeline") sau ca o „bandă transportoare", prin care se transmite ADN cromozomal sau plasmidic.

O altă proprietate a pililor este aceea că poartă receptori pentru fagii fără coadă, constituind o însuşire importantă în identificarea pililor de sex prin electronografii şi pentru diferenţierea lor de fimbrii. În acest caz, pilii suplinesc lipsa „cozii" acestor fagi servind drept conduct prin care se realizează transferul genomului fagic în celula bacteriană. Pierderea pililor prin mutaţie implică dobândirea rezistenţei faţă de fagii respectivi.

3.2. Învelişul celular al bacteriilor

Majoritatea bacteriilor posedă un înveliş extern complex din punct de vedere chimic, care timp îndelungat a fost considerat ca fiind reprezentat numai de perete celular. Un studiu mai amănunţit a arătat, în cele din urmă că majoritatea celulelor prezintă învelişuri de suprafaţă de diverse tipuri. Anatomia suprafeţei şi a peretelui bacterian este atât de diversă, încât pentru complexul de straturi exterioare protoplasmei celulare vom folosi termenul colectiv de înveliş celular. Straturile învelişului sunt stivuite unul peste celălalt şi sunt deseori legate etanş între ele ca învelişurile unei arahide. Cele trei straturi de bază care pot fi identificate pe micrografii electronice, sunt glicocalixul respectiv capsula bacteriană, peretele celular şi membrana celulară. Deşi fiecare din straturile învelişului îndeplineşte o funcţie distinctă, ele acţionează de asemenea împreună, ca o unitate protectoare unică. Învelişul poate reprezenta de la o zecime până la jumătate din volumul unei celule. Suprafaţa celulei bacteriene este frecvent expusă unor condiţii aspre ale mediului înconjurător. Glicocalixul, respectiv capsula bacteriană sunt învelişuri externe ale celulei bacteriene ce se dezvoltă pentru a proteja celula şi în unele cazuri pentru a o ajuta să adere la mediul său înconjurător.

3.2.1. Stratul mucos şi capsula bacteriană

Unele bacterii sunt acoperite de un înveliş lax, solubil, numit şi strat mucos care le protejează împotriva pierderilor de apă şi de substanțe nutritive.

Anumite bacterii produc diverse tipuri de capsulă formate din unități repetitive de polizaharide, polipeptide sau o combinație a acestora.

Spre deosebire de stratul mucos o capsulă este într-o oarecare măsură legată de celulă având o consistență densă, vâscoasă care conferă un caracter predominant mucoid coloniilor celor mai multor bacterii capsulogene. Deşi capsulele şi alte structuri de suprafață îndeplinesc diferite funcții, nu sunt absolut esențiale pentru supraviețuirea bacteriilor.

Speciile bacteriene patogene formatoare de capsulă sunt: *Bacillus anthracis, Streptococcus, Klebsiella pneumoniae, Pasteurella multocida, Clostridium perfringens, Leuconostoc, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae*. Capsulele diferă între ele, de la o bacterie la alta, ca grosime, organizare şi compoziție chimică (tabel 3.1.).

În funcție de structura şi raporturile sale cu celula bacteriană se pot descrie următoarele feluri de capsulă:

- Microcapsula, strat fin şi aderent de peretele celular, de 0,2 μ grosime, detectabilă numai prin metode imunologice caracteristice pentru Pasteurella multocida.
- Capsula propriu-zisă, se prezintă ca o formațiune morfologic distinctă, consistentă şi evidențiabilă prin metode speciale de colorare având o grosime care depăşeşte 0,2 μ. Este caracteristică pentru *Bacillus anthracis* şi *Streptococcus pneumoniae* învelind de jur împrejur fiecare celulă, o pereche sau un lanț întreg de celule.

Tabel 3.1

Tipuri capsulare la diferite specii bacteriene

Specia bacte-riană	**Compoziția chimică**	**Consistență**	**Grosimea**	**Denumire Aspect**	**Evidențiere Observații**
Bacillus anthracis	Polipeptidică polimer al acidului glutamic dextrogir	Distinctă	Groasă (peste 0,2 μm)	Capsulă propriu-zisă	Metodele speciale: Giemsa, albastru de toluidină, colorația cu tuş de China
Streptococcus pneumoniae	Polizaharidică (rețea ondulată pericelulară)	Distinctă	Subțire (sub 0,2 μm), cir-cumscrie o grupare diplo	Capsulă propriu-zisă	Prin metode speciale de colorare (directe şi indirecte)

Klebsiella pneumoniae	Polizaharidică (structură lamelară alcătuită din straturi suprapuse)	Scăzută (mucoasă)	Groasă difuză (20-25 nm)	Substanță mucoasă capsulară	Se depune sub formă de mase vâscoase fără semnificație anatomică
Pasteurella multocida	Polizaharidică	Consistentă	Foarte subțire	Microcap-sulă	Detectabilă numai prin metode imunologice
Leuconostoc	Homopolizaharide (cu un singur tip de zahăr-glucan)				
Pseudomonas aeruginosa	Heteropolizaharide polimeri de D-glucoză, D-galactoză, D-manoză, acid D-glucuronic	Moale			
Bacterii saprofite (în medii naturale)	Polizaharidică	Moale	Groasă, compusă din colonii mucilaginoase de bacterii	Zoogleea	

Substanța mucoasă capsulară este moale, difuză, prezentă uneori în mediu sub formă de mase vâscoase dispuse fără semnificație anatomică în jurul celulei bacteriene, prezentă la *Klebsiella pneumoniae*.

➢ Zoogleea sau masa zoogleică, impropriu denumită astfel, (*zoon*-animal, *gloea*-substanță gelatinoasă) cuprinde mai multe celule bacteriene alcătuind adevărate colonii mucilaginoase. Se întâlneşte la unele bacterii saprofite din mediile naturale.

S-a observat prin microscopie electronică că în timp ce la *Streptococcus pneumoniae*, polizaharidele capsulare formează o rețea ondulată, pericelulară, la *Klebsiella pneumoniae* capsula are o structură lamelară alcătuită din straturi suprapuse cu o grosime de 20-25 nm.

Stratul mucos formează în jurul bacteriilor o rețea laxă şi difuză de exopolizaharide, fără o structură definită, în timp ce capsula este strâns aderentă de peretele celular datorită legării polizaharidelor capsulare de peretele bacterian prin legături ionice şi uneori prin legături covalente.

Datorită indicelui de refracție foarte apropiat de cel al mediului, capsula este greu de observat prin microscopie directă. Colorată prin metoda Gram sau prin metoda negativă cu tuş de China (India), capsula rămâne ca un halou pericelular incolor şi refringent, în timp ce fondul

preparatului şi celulele vegetative apar colorate. Evidenţierea capsulei în mod direct se poate realiza numai prin microscopie electronică sau prin coloraţii speciale: Giemsa, albastru de toluidină.

Capsula şi stratul mucos sunt în general de natură polizaharidică, excepţie făcând *Bacillus anthracis* la care este de natură polipeptidică – nu polimer al acidului glutamic dextrogir.

Deoarece capsulele pot fi antigenice (antigene complete sau haptene) ele constituie baza unor vaccinuri şi teste serologice. La *Streptococcus pneumoniae*, antigenele capsulare constituie un criteriu de clasificare, deosebindu-se mai multe grupe şi tipuri antigenice.

Capsula reprezintă un produs inert rezultat din activitatea metabolică a celulei bacteriene ce poate fi îndepărtată fără a pune în pericol viaţa celulei bacteriene. Totuşi, are o semnificaţie biologică importantă prin faptul că prezintă proprietăţi higroscopice, protejând celula de efectul nociv al disecaţiei şi poate constitui de asemenea un rezervor important de stocare a substanţelor nutritive.

Celulele bacteriene încapsulate au în general virulenţă mult mai mare decât cele neîncapsulate, deoarece capsula le protejează împotriva fagocitelor, fiind astfel libere să se multiplice şi să lezeze ţesuturile organismelor umane sau animale.

Rolul antifagocitar al capsulei se realizează fie prin substanţele pe care le conţine, fie prin împiedicarea adeziunii la suprafaţa leucocitului.

Capsula bacteriană poate avea un rol important şi în colonizare. De exemplu, pelicula albă, groasă care se formează pe dinţi, se datorează mucusului de suprafaţă produs de unii streptococi din cavitatea bucală. Acest mucus le permite iniţial să aibă un punct de sprijin pe dinţi şi să creeze o cale de acces pentru alte bacterii orale, care în timp pot duce la carii dentare.

Unele bacterii au capacitatea să producă capsule extrem de aderente, fiind răspunzătoare de colonizarea persistentă a unor materiale inerte, de exemplu, catetere din plastic, dispozitive intrauterine şi alte obiecte, de uz medical curent.

3.2.2. Structura rigidă a peretelui celular bacterian

Structura bacteriană care se află imediat dedesubtul capsulei, se numeşte perete celular. Acesta este răspunzător de o serie de caracteristici bacteriene importante. În general, el determină forma bacteriei şi asigură tipul de suport structural necesar pentru a proteja celula bacteriană împotriva ruperii din cauza variaţiilor de presiune. Astfel, peretele celular funcţionează ca o anvelopă de bicicletă care îşi menţine forma necesară şi protejează membrana citoplasmatică, care este mai delicată, împotriva

ruperii când este umplut cu aer. Caracterul protector, relativ rigid al peretelui se datorează unei macromolecule unice, numită peptidoglican. Acesta este reprezentat de un polimer gigant compus din catene repetitive lungi de glican legate încrucişat prin fragmente peptidice scurte. Peptidoglicanul nu reprezintă singurul component al peretelui celular, iar cantitatea acestuia variază în funcție de grupele bacteriene.

Semnificația biomedicală a peptidoglicanului din peretele celular. Datorită faptului că majoritatea bacteriilor trăiesc în habitate care conțin şi o cantitate considerabilă de apă liberă, acestea absorb în permanență prin osmoză excesul de apă. Dacă nu ar exista forța şi rigiditatea relativă a peptidoglicanului din peretele celular, acesta ar exercita în curând o presiune capabilă de a rupe bacteriile. Înțelegerea funcției „legături slabe" a reprezentat un ajutor enorm pentru industria medicamentelor folosite în tratamentul infecțiilor (peniciline, cefalosporine) acestea fiind eficiente, datorită faptului că împiedică formarea normală a stratului de peptidoglican al bacteriilor.

Astfel de celule, cu pereții incompleți sau absenți, sunt foarte slab protejate împotriva lizei. Unele dezinfectante (alcool, detergenți) omoară, de asemenea, celulele bacteriene prin deteriorarea peretelui celular. Lizozimul conținut în lacrimi şi salivă, reprezintă un mijloc de apărare natural ce ajută la distrugerea anumitor bacterii prin dizolvarea peptidoglicanului.

Diferențe structurale privind peretele celular. Cu peste 100 de ani în urmă, cu mult înainte ca anatomia detaliată a bacteriilor să fie cunoscută, un medic danez, Hans Christian Gram a elaborat o tehnică de colorare (colorația Gram) care delimitează două grupe de bacterii complet diferite. Deşi cauzele nu au fost precizate, timp de mulți ani, reacțiile contrastante care au loc prin această colorație se datorează în totalitate unor diferențe fundamentale privind morfologia pereților celulari bacterieni.

Cele două grupe principale evidențiate prin această tehnică sunt numite bacterii Gram pozitive şi bacterii Gram negative. Deoarece, colorația Gram nu precizează natura acestor diferențe fizice, trebuie să ne adresăm microscopiei electronice şi analizei biochimice.

Colorația Gram. În 1884, Hans Christian Gram, a elaborat o tehnică de colorare, prin folosirea căreia bacteriile au devenit mai vizibile în probele infecțioase prelevate. Tehnica sa a constat în aplicarea secvențială de cristal violet (violet de gențiana), colorantul principal, Lűgol (care reprezintă mordantul pe bază de iod şi iodură de potasiu), alcool acetonă (decolorantul) şi safronină (fuxină) – colorantul de contrast. În final, bacteriile care se colorează în violet (purpuriu) au fost denumite Gram pozitive, iar cele care se colorează în roşu au fost denumite Gram

negative.

Deşi, aceste reacţii de colorare implică o atracţie a celulei spre un colorant încărcat este important de menţionat că termenii „Gram pozitiv" şi „Gram negativ" nu indică sarcina electrică a celulelor sau coloranţilor, ci faptul că o celulă reţine sau nu complexul colorant principal – mordant după decolorare. Nu este nimic specific în reacţia celulelor Gram pozitive la colorantul principal sau a celor Gram negative la colorantul de contrast. Astăzi, ştim că teoria chimică privitoare la coloraţia Gram, implică diferenţe structurale ale peretelui celular şi ale modului cum reacţionează acesta la acţiunea reactivilor. În prima fază, cristalul violet (violetul de genţiana) colorează toate celulele unui eşantion în aceeaşi culoare violet (purpurie). Adăugarea mordantului (intensificatorului) constituie o etapă cheie în diferenţierea coloraţiei deoarece mordantul, soluţia Lűgol, formează cristale mari cu colorantul, care sunt dispuse în reţeaua de peptidoglican a peretelui celular. Deoarece, stratul de peptidoglican este mai mare la celulele Gram pozitive reacţia este mult mai amplă decât în cele Gram negative cu perete mult mai subţire. În plus, când se aplică decolorarea, lipidele din membrana externă a celulelor Gram negative sunt dizolvate în alcool acetonă, ceea ce permite îndepărtarea colorantului, în timp ce cristalele de colorant captat de peretele celular al bacteriilor Gram pozitive sunt relativ inaccesibile şi rezistente la îndepărtare. Deoarece, bacteriile Gram negative vor fi incolore după etapa aplicării alcool acetonei, prezenţa lor este demonstrată prin aplicarea colorantului de contrast, fuxina (safronina).

Această metodă veche de un secol, rămâne baza universală pentru taxonomia şi identificarea bacteriilor. Ea permite diferenţierea a patru categorii principale pe baza reacţiei de culoare şi a formei: bacili (bastonaşe) Gram pozitivi, coci Gram pozitivi, bacili Gram negativi, coci Gram negativi. Pe lângă utilizarea sa în clasificarea bacteriilor, coloraţia Gram reprezintă o metodă practică de diagnostic în infecţiile bacteriene şi dirijarea tratamentului medicamentos.

De exemplu, frotiurile efectuate din probe de urină proaspătă sau exsudat faringian prin metoda Gram pot ajuta la depistarea cauzei posibile a unei infecţii putând fi instituit tratamentul medicamentos. Chiar şi astăzi, când există o tehnologie medicală complexă şi sofisticată coloraţia Gram rămâne un prim instrument de diagnostic important şi inegalabil.

Gradul de diferenţiere între bacteriile Gram pozitive şi cele Gram negative este demonstrat clar de aspectul fizic al învelişurilor lor celulare. O secţiune microscopică a peretelui celulelor Gram pozitive este asemănătoare unui sandviş (deschis anterior) alcătuit din două straturi: peretele celular extern, gros, compus în special din peptidoglican şi membrana celulară. Ţinând seama de această structură, vom examina în

continuare pereții celor două tipuri de celule.

3.2.2.1. Peretele celular al bacteriilor Gram pozitive

Peretele celular al bacteriilor Gram pozitive, în general, aderă strâns la membrana celulară, spațiul între cele două componente fiind foarte mic.

Bacteriile Gram pozitive au peretele constituit din peptidoglican, care este componentul major şi reprezintă 80-90 % din greutatea uscată. Apare foarte net după colorare cu săruri ale metalelor grele şi poate fi degradat prin tratare cu lizozim. Sensibilitatea la lizozim este mai mare în faza logaritmică, când stratul peptidoglicanic este incomplet dezvoltat.

În masa peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive există o teacă groasă compusă din diferite fâşii de peptidoglican; ea conține de asemenea polizaharide acide strâns legate, incluzând acizii teichoici.

Peptidoglicanul sau mureina (lat. murus – perete), alcătuieşte stratul bazal, fiind caracteristic şi comun tuturor bacteriilor (cu excepția genului *Mycoplasma*) şi este un heteropolimer compus dintr-o porțiune glican şi o componentă peptidică.

Peptidoglicanul este format din macromolecule lungi (filete polizaharidice) paralele, legate între ele prin punți (β1,4) polipeptidice realizând o rețea cu ochiuri foarte regulate, model hexagonal care încorsetează protoplastul asigurându-i rezistența mecanică.

Filetele polizaharidice sunt formate din două zaharuri aminate care alternează, acidul N – acetilmuramic şi N – acetilglucozamină (legătură care este ținta acțiunii lizozimului). Componenta peptidică este reprezentată de un tetrapeptid cu structura L-alanil-γ-D-glutamil, L-R3-D-alanină în care natura restului L-R3 variază de la o bacterie la alta. Astfel, L-R3 poate fi un aminoacid neutru dicarboxilic sau aminoacid diaminat.

Unitățile tetrapeptidice aparținând lanțurilor de glican sunt legate prin intermediul unor „punți" specializate, interpeptidice. Legăturile se fac între grupul carboxil al D-alaninei terminale a unui lanț peptidic şi grupul liber NH2 al acidului diaminopimelic pe al doilea lanț.

Dintre compuşii citați, acidul muramic, D-alanina, acidul D-glutamic şi acidul pimelic sunt întâlniți în natură numai la bacterii.

La bacteriile Gram pozitive sacul peptidoglicanic formează o moleculă gigantă, rigidă, de 5×10^6 kDa) cu o foarte mare variabilitate de compoziție chimică, având o structură de rețea tridimensională, deoarece legăturile încrucişate (cross – linked) se fac în două planuri ale spațiului.

Acizii teichoici (gr. teichos – zid, perete) sunt prezenți numai la bacteriile Gram pozitive fiind reprezentați de:

Acizii teichoici parietali – nu se găsesc la toate bacteriile Gram

pozitive, iar formarea lor este dependentă de condiţiile de cultivare şi de mediu. Se găsesc la suprafaţa celulei şi sunt legaţi covalent de stratul peptidoglicanic al peretelui celular.

Acizii teichuronici – sunt legaţi de peretele celular şi pot fi găsiţi la aceeaşi bacterie asociaţi cu acizii teichoici.

Acizii teichoici membranari sau lipoteichoici sunt legaţi covalent de formaţiunea glicolipidică a membranei plasmatice formând o reţea între aceasta şi peretele celular.

Asocierea lor covalentă cu glicolipidele a dus la denumirea de acizi lipoteichoici.

Datorită acestei aşezări, acizii lipoteichoici rămân ancoraţi în membrana protoplastului atunci când bacteriile Gram pozitive sunt convertite la protoplaşti. Datorită faptului că pot fi izolaţi din interacţiunea „intracelulară" a celulelor rupte sunt numiţi şi acizi teichoici „intracelulari". Acizii lipoteichoici sunt constituenţi mult mai caracteristici pentru bacteriile Gram pozitive decât acizii teichoici, iar sinteza lor nu este dependentă de condiţiile de creştere.

Rolul acizilor teichoici.

- Funcţia principală a acizilor teichoici constă în menţinerea structurii tridimensionale a peptidoglicanului de care sunt legaţi, conferind extinderea peretelui celular în cursul creşterii şi diviziunii celulare. Contribuie de asemenea la încărcătura acidă de pe suprafaţa celulei.
- Acizii teichoici au rol esenţial în menţinerea unei concentraţii de ioni metalici (Mg^{2+}) în micromediul reprezentat de suprafaţa externă a membranei plasmatice. Ei funcţionează ca un mecanism molecular de creştere a concentraţiei de Mg^{2+} pe suprafaţa celulară. Dovada o constituie faptul că în culturi deficiente în Mg^{2+}, cantitatea de acizi teichoici creşte.
- Acizii teichoici joacă un rol important ca determinanţi de patogenitate (inhibă fagocitoza).
- Acţionează ca determinanţi ai reacţiilor de hipersensibilitate.
- Controlează activitatea autolizinelor.
- Acţionează ca receptori de fagocitoză şi colicine.

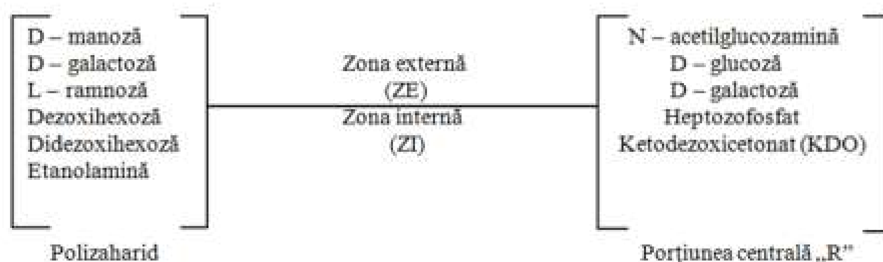
3.2.2.2. Peretele celular al bacteriilor Gram negative

Peretele celulelor Gram negative prezintă o morfologie mai complexă decât peretele celular al bacteriilor Gram pozitive, deoarece conţine o membrană externă (OM – outer membrane), un strat subţire de peptidoglican şi un spaţiu larg între peptidoglican şi membrana celulară. Structura membranei externe este întrucâtva asemănătoare structurii membranei celulare, cu excepţia faptului că, în plus, conţine fosfolipide

(35%); proteine (15%); lipopolizaharide (50%). Foița exterioară a membranei externe este constituită dintr-un lipozaharid (LPS) care este în principal un polizaharid integrat într-un strat de lipide. Lipozaharidele sunt alcătuite dintr-o componentă lipidică (lipidul A) legată covalent de un oligozaharid (porțiunea centrală R) care la rândul său este legat de un polizaharid. Structura lipidului A şi a porțiunii R sunt relativ invariabile, iar polizaharidul este foarte variabil ca structură şi compoziție chimică formând antigenul „O" sau polizaharidul „O". Structura LPS bacterian este tipică la celulele ce aparțin variantelor „S" (smooth), în timp ce variantele „R" (rough) nu au polizaharid „O", ci au de cele mai multe ori o porțiune „R" incompletă.

Polizaharidul „O" (regiunea I a LPS) are o structură de bază simplă alcătuită din secvențe de glicozaharide repetitive care conțin de obicei 2-4 componenți monozaharidici. Compoziția în zaharuri diferă de la o specie la alta şi chiar în cadrul speciei, determinând specificitatea antigenică a bacteriilor respective precum şi gruparea lor în serotipuri şi chemotipuri (diferențiate biochimic) pe baza similarității în compoziția chimică a AgO. AgO acționează şi ca situs receptor specific în procesul de fagocitoză.

Schema 3.2. Formula generală a LPS bacterian



Porțiunea R centrală a LPS (regiunea a II-a) este aproape identică la salmonele, fiind diferită la *Escherichia coli* şi *Shigella*. Această porțiune este divizată în două zone: internă (ZI) şi externă (ZE).

Foița interioară a membranei externe este constituită dintr-un strat lipidic, fixat prin proteine de stratul de peptidoglican de dedesubt.

Lipidul A (regiunea a III-a) conține acizi graşi diferiți de cei prezenți în fosfolipide (60-70%); glucozamino-4-fosfat (10-20%) şi etanolamină.

Lipidul A este răspândit printre moleculele de fosfolipide ale membranei externe a peretelui celular şi poartă legat de el porțiunea R a LPS. Lipidele A reprezintă o familie de lipide bacteriene ce conțin o varietate de acizi graşi (cu 10-17 atomi de carbon) caracteristici pentru fiecare grup de bacterii.

La *Spirillum serpens* stratul tetragonal conferă rezistență față de

infecția şi parazitismul lui *Bdellovibrio bacteriovorus* mascând sinusurile receptoare pe care se fixează bacteria parazită înainte de a pătrunde în bacteria gazdă.

Stratul interior al peretelui bacteriilor Gram negative este constituit dintr-un singur strat de peptidoglican şi lipoproteine. Are o grosime de 1,5-3,0 nm, fiind electronodens. Este legat de membrana plasmatică prin intermediul unor peptidoglicani în curs de formare. În acelaşi timp, stratul peptidoglicanic este legat covalent de stratul membranei externe prin intermediul unor molecule globulare de lipoproteine situate pe suprafața sa externă.

Stratul peptidoglicanic reprezintă 2,4-10 % din greutatea peretelui celular şi o compoziție chimică foarte asemănătoare la toate bacteriile Gram negative.

Semnificația biologică. Membrana externă a peretelui celular are rolul unei „site moleculare" permițând pătrunderea unor molecule relativ mici cum ar fi oligopeptide, oligozaharide şi a unor substanțe hidrofile cu greutate moleculară de ~700 Da. Accesul este realizat prin nişte canale transmembranare formate din molecule proteice, numite *porine* care se găsesc în toată membrana externă.

Mărimea acestor porine poate fi modificată în aşa măsură, încât pot bloca pătrunderea unor preparate chimice, ca de exemplu, anumite antibiotice reprezentând astfel şi un mijloc de apărare a bacteriei Gram negative.

Membrana externă reține în spațiul periplasmic enzimele degradative sintetizate în celulă după ce au traversat membrana citoplasmatică, precum şi o largă varietate de molecule nutritive.

De asemenea, reprezintă sediul unor sisteme de transport specifice (pentru vitamina B_{12}, maltoză, nucleozide).

LPS din membrana externă poartă un număr mare de determinanți antigenici care conferă specificitatea în cazul antigenelor somatice bacteriene (~1000 serotipuri de *Salmonella*).

Peretele celular reprezintă sistemul de susținere mecanică, un fel de corset neelastic al întregii arhitecturi celulare; determină forma celulei bacteriene datorită rigidității sale; asigură protecția față de şocul osmotic; participă la procesul de creştere şi diviziune celulară urmând membrana citoplasmatică în formarea septurilor transversale care după replicarea cromozomului bacterian separă celula mamă în cele două celule fiice.

Semnificația biomedicală a diferențelor între pereții celulari. Anatomia celor două tipuri de bacterii, Gram pozitive şi Gram negative, presupune şi alte diferențe pe lângă reacția de colorare. Am menționat mai sus modul cum membrana externă constituie o barieră în plus la bacteriile Gram negative, pentru încetinirea sau oprirea pătrunderii unor preparate

antimicrobiene. Din cauza acestei impermeabilități, bacteriile Gram negative sunt în general mai greu de inhibat sau de omorât decât cele Gram pozitive.

Tratamentul infecțiilor provocate de bacteriile Gram negative necesită deseori medicamente diferite şi o terapie mai agresivă decât tratamentul infecțiilor produse de cele Gram pozitive.

De asemenea, bacteriile Gram pozitive sunt mai sensibile la coloranți şi la unele tipuri de dezinfectante.

Peretele celular sau părțile sale constituente pot interacționa cu țesuturile omului şi animalelor şi pot contribui la îmbolnăvire. LPS din membrana externă a bacteriilor Gram negative constituie un factor patogen în unele boli datorită toxicității lor la om şi mamifere.

Proteinele ataşate de porțiunea externă a peretelui celular al mai multor specii Gram pozitive, incluzând genurile *Corynebacterium* şi *Staphylococcus* au de asemenea proprietăți toxice.

Lipidele din pereții celulari ai anumitor specii de *Mycobacterium* sunt nocive şi pentru celulele mamiferelor şi ale omului. Deoarece majoritatea macromoleculelor din pereții celulari nu există la animale şi om, ele stimulează sistemul imun să producă anticorpi.

3.2.3. Spațiul periplasmic

Între peptidoglican şi membrana celulară a bacteriilor Gram negative se află o regiune bine dezvoltată, numită spațiul periplasmic (din greacă, peri – în jurul şi plasm – modelat, format).

Acest spațiu este un receptacul important şi un loc de reacție pentru un grup mare şi variat de substanțe care intră şi ies din celulă. El conține enzime care sunt implicate în digestia moleculelor ce intră în celulă şi a proteinelor speciale de legare cu rol în transportul celular.

Semnificația biologică. Funcția principală a enzimelor periplasmice (fosfataze, sulfataze, amidaze) este de a pregăti chimic substanțele care difuzează prin membrana externă pentru trecerea lor în citoplasmă. Prin acest mecanism, enzimele degradative acționează pe o largă varietate de substraturi întâlnite în natură la bacteriile Gram negative, care difuzează până în această zonă a peretelui celular unde sunt convertite în molecule transportabile în celulă, imediat accesibile proteinelor de legare şi permeazelor.

Unele proteine periplasmice (de exemplu proteinele de legare şi citocromii periplasmici) îndeplinesc şi funcția de purtători între enzimele legate de membrană şi substraturi.

Proteinele de legare au rol şi în chimiotaxie şi mobilitate, deoarece s-a demonstrat că receptorii chimiotaxici sunt proteine periplasmice.

Excepții privind peretele celular. Mai multe grupe bacteriene sunt lipsite de structura peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive sau Gram negative, iar unele bacterii nu au deloc perete celular deşi aceste forme excepționale se pot colora pozitiv sau negativ prin metoda Gram. Examinarea ultrastructurii lor şi a componentelor chimice arată că aceste bacterii nu corespund întocmai descrierii celulelor Gram pozitive sau Gram negative.

De exemplu, bacteriile din genul *Mycobacterium* şi *Nocardia* conțin peptidoglican şi se colorează Gram pozitiv, dar partea principală a peretelui lor celular cuprinde tipuri unice de lipide. Unul dintre acestea este un acid gras, cu lanț foarte lung, numit acid micolic sau „factor cord" cu rol în patogenitatea bacteriei.

Caracterul dens şi ceros conferit peretelui celular de aceste lipide este de asemenea răspunzător de un grad mare de rezistență la anumite substanțe chimice şi la anumiți coloranți. O astfel de rezistență constituie baza colorației Ziehl – Neelsen sau Kinyoun folosite pentru diagnosticarea tuberculozei. În această colorație fuxina Ziehl fierbinte se fixează solid de aceste celule, astfel încât o soluție alcoolică acidă nu îndepărtează colorantul.

Un grup neobişnuit de bacterii, numite arhebacterii au de asemenea pereți celulari chimic diferiți şi complecşi. Unele dintre aceste bacterii au pereți compuşi aproape în totalitate din polizaharide, altele pur proteici, dar ca grup toate sunt lipsite de structura peptidoglicanică propriu-zisă, descrisă mai sus. Deoarece câteva arhebacterii şi toate micoplasmele sunt total lipsite de perete celular, membrana acestora trebuie să îndeplinească atât funcția de protecție cât şi pe cea de transport. Aceste forme au o membrană celulară stabilizată şi întărită de tipuri speciale de lipide.

Unele bacterii, care în mod obişnuit posedă perete celular îl pot pierde în cursul unei părți a ciclului lor vital. Aceste forme lipsite de pereți sunt denumite forme L sau variante ale fazei L. Formele L se nasc natural printr-o mutație în genele formatoare de pereți sau pot fi induse artificial prin tratare cu o substanță chimică, ca lizozim sau penicilină, care rup peretele celular. Când o celulă Gram pozitivă este expusă uneia dintre aceste două substanțe, aceasta îşi pierde complet peretele celular şi devine un *protoplast* (o celulă fragilă mărginită numai de o membrană foarte sensibilă la liză). O celulă Gram negativă expusă aceloraşi substanțe pierde peptidoglicanul, dar îşi menține membrana externă, formând un *sferoplast*.

Există dovezi în sensul unui rol al formelor L în anumite infecții (de exemplu în „boala ghearelor de pisică").

Formele „L" au fost numite astfel după inițiala institutului „Lister", în care s-a făcut prima observație, au fost descoperite de Klienebergir-

Mobel (1935) la *Streptobacillus moniliformis*, fiind considerate entități biologice independente provenite dintr-o contaminare exogenă. Ulterior au mai fost descrise şi alte bacterii: *Proteus vulgaris, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Salmonella, Shigella, Bacillus, Clostridium, Neisseria, Streptococcus, Staphylococcus* etc. Se caracterizează prin absența peretelui celular pe lângă unele aspecte morfologice şi culturale particulare, o mare sensibilitate la variațiile de presiune osmotică, dar pot supraviețui şi se pot dezvolta dacă mediul este echilibrat din punct de vedere osmotic. Au fost descrise trei tipuri de forme „L”:

1. *Forme „L” stabile* sau *de tip A* (forme „L” veritabile) – care nu se întorc niciodată la forma bacteriană tipică.

2. *Forme „L” instabile* sau *de tip B* – care păstrează elemente ale peretelui celular care revin constant la forma bacteriană tipică şi corespund sferoplaştilor

3. *Forme „L”* sau *de tip C* – care păstrează elemente din peretele celular dar pierd progresiv capacitatea de revenire la normal.

Supraviețuirea acestor forme depinde de gradul de tamponare osmotică a mediului de cultură, putând fi menținuți viabili în medii artificiale, tamponate osmotic până la echivalentul mediului lor intern, medii hipertonice (cu conținut solvit crescut, 10-20%). În medii sub izotonia mediului lor intern, aceste forme se umflă prin imbibiție, membrana citoplasmatică se rupe şi citoplasma se elimină, mor.

Protoplaştii sunt în general neviabili, greu adaptabili, chiar în medii artificiale foarte bine tamponate. Sferoplaştii sunt mai rezistenți, în medii de cultură optime, lipsite de factorul care a indus defecțiunea (lizozim, antibiotice), ei sunt uşor reversibili la bacteria parentală normală cu perete. Reversibilitatea are loc uşor pe oul embrionat de găină. Testul cel mai eficient prin care se observă că a avut loc recuperarea peretelui este revenirea colorabilității prin metoda Gram pentru bacteriile Gram pozitive. Lipsa mucocomplexului la protoplaşti determină apariția formelor sferoidale de dimensiuni diferite, granulare, globulare, gigante, indiferent care este forma bacteriei din care provin.

Sferoplaştii, bacterii cu „schelet” defectiv iau forme mai diferite: filamentoase, piriforme, aspecte de înmugurire, etc.

3.2.4. Membrana citoplasmatică (membrana plasmatică, membrana celulară)

Următorul strat care apare chiar sub peretele celular este membrana citoplasmatică (celulară), un înveliş flexibil, foarte subțire (4-5 nm), elastic, care înconjoară complet conținutul intern al celulei.

Cuvântul membrană ca atare desemnează orice înveliş inclusiv structuri multicelulare ca mucoasele corpului. Privind însă prin perspectiva unei singure celule, o membrană reprezintă o fâşie foarte subţire compusă din molecule lipidice specializate (reprezentând în medie 40% din conţinut) şi molecule proteice (aproximativ 60%).

Excepţiile principale la această descriere sunt reprezentate de membranele micoplasmelor care conţin o cantitate mare de lipide numite steroli (molecule rigide care au funcţia de stabilizare a membranei) precum şi de membranele arhebacteriilor (care conţin lipide cu acizi graşi liberi).

Membranele apar în mai multe regiuni ale unei celule, dar rolul lor principal este acela de membrană celulară sau citoplasmatică care înconjoară protoplasma.

Membrana celulară este atât de subţire (are în medie o grosime de 0,007μm) încât nu poate fi vizualizată la microscopul optic obişnuit. Examinată la microscopul electronic pe secţiuni ultrafine are un aspect asemănător unei şine de tren apărând ca o formaţiune triplu stratificată alcătuită din două straturi întunecate care separă un strat mai clar.

Robertson a denumit această structură „unitate de membrană" („unit-membrane") datorită faptului că ea reprezintă unitatea structurală din care sunt alcătuite straturile membranare complexe (de exemplu: teaca de mielină a fibrelor nervoase medulare).

În urma unei analize microscopice şi chimice mai detaliate S.J. Singer şi C.K. Nicholson au emis o teorie simplă şi interesantă privind structura membranelor numită „modelul mozaicului fluid". Conform acestei teorii o membrană este constituită dintr-un dublu strat de fosfolipide amfipatice, cu orientare polară a regiunilor hidrofile spre exterior, respectiv interior, şi a celor hidrofobe faţă în faţă. Acest strat bimolecular fosfolipidic îi conferă membranei rolul de barieră osmotică şi oferă proteinelor enzimatice un sediu care permite deplasarea lor către exteriorul sau interiorul celulei. Poziţia lor este proeminentă spre una sau ambele feţe ale membranei. Fosfolipidele formează un film fluid, discontinuu în care plutesc proteinele globulare, în timp ce glucidele interacţionează fie cu unele, fie cu altele.

Membrana citoplasmatică poate fi pusă în evidenţă la microscopul fotonic, fie după o colorare cu albastru Victoria sau în cazul bacteriilor vii, în câmp întunecat apare ca o linie netă, luminoasă, strălucitoare.

Lipidele se găsesc în membrană sub formă de fosfolipide care sunt molecule amfipatice cu structură complexă ce posedă o extremitate polară, hidrofilă (hidrosolubilă în stare izolată) şi o regiune nepolară, hidrofobă (insolubilă în apă) care reprezintă „cozile" moleculei formată din doi acizi graşi. În soluţie apoasă se organizează spontan, moleculele aranjându-se

„coadă la coadă” astfel încât lanțurile hidrofile (polare) să fie expuse spre soluția apoasă, iar lanțurile hidrofobe (nepolare) să fie orientate în direcția opusă contactului cu apa. Astfel, cele două monostraturi de molecule vor forma împreună două straturi hidrofile periferice separate de porțiunea centrală hidrofobă.

Fiecare dublu strat fosfolipidic este un „lichid bidimensional” în care moleculele lipidice difuzează lateral, schimbându-şi poziția până la un milion de ori pe secundă. Moleculele se deplasează de pe un monostrat pe altul (tranziția flip-flop) foarte rar (cel mult o dată pe lună pentru o moleculă dată) ceea ce permite menținerea compoziției membranei şi a structurii ei caracteristice.

Prezența mai multor tipuri de fosfolipide conferă o arhitectură mai fluidă care facilitează transportul activ prin biomembrane.

Fosfolipidele sunt răspunzătoare de integritatea structurală a membranei citoplasmatice şi îi conferă acesteia impermeabilitate la cele mai multe molecule hidrosolubile care sunt insolubile în regiunea „uleioasă” a părții de mijloc a membranei.

Proteinele. În funcție de poziția lor în membrană sunt de două tipuri:

1. *integrate (intrinsece)* – insolubile în apă, nu pot fi îndepărtate fără ruperea stratului dublu de lipide. Orientarea lor este fixă, fiecare proteină de acelaşi tip fiind îndreptată în aceeaşi direcție.

Proteinele integrate pot să străbată toată grosimea membranei celulare (proteine transmembranare) sau se pot găsi fie pe suprafața internă (care vine în contact cu citoplasma), fie pe suprafața externă.

2. *de suprafață (periferice sau extrinsece)* sunt în general hidrosolubile şi se găsesc fie pe fața externă, fie pe cea internă a dublului strat lipidic, fiind de regulă legate de proteinele integrate.

Proteinele de membrană joacă rolul de: enzime, de proteine de transport, asigurând transportul moleculelor solubile din mediu în celulă şi invers, de citocromi şi alte proteine care aparțin sistemului transportor de electroni, de proteine cu activitate adenozintrifosfatazică (ATP-ază), de fosfolipaze, de proteaze, pepsidaze, etc.

Glucidele se găsesc sub forma unor polizaharide legate fie de proteine (glicoproteine) fie de lipide (glicolipide).

Semnificația biologică. Structura membranei citoplasmatice explică comportamentul şi funcțiile sale în celulă. Aceasta prezintă o asimetrie funcțională, datorită faptului că suprafața internă funcționează diferit de cea externă cu importanță esențială pentru viața celulei. Faza lipidică asigură o barieră de nepătruns pentru multe substanțe, ceea ce explică capacitatea membranei:

- de a controla transportul de molecule în interiorul şi în afara

celulei;

- de a prezenta permeabilitate selectivă;
- de a separa reacțiile în interiorul celulei.

Proteinele membranare îndeplinesc multe funcții, şi anume acelea de a primi semnale moleculare, de a lega molecule (funcția de receptor), de a acționa ca enzime şi de a servi drept canale de transport.

Această structură explică multe caracteristici ale membranelor, respectiv flexibilitatea, solubilitatea, permeabilitatea şi capacitatea de transport.

Datorită structurii sale fluide componenții se pot deplasa în stratul bidimensional în aşa fel încât activitățile funcționale ale membranei pot implica modificări atât în conformația sa cât şi în aranjamentul componenților.

Deoarece bacteriile nu posedă organite (organe) membrana celulară îndeplineşte numeroase funcții legate de transport, de fosforilare, de prelucrare a substanțelor nutritive şi de sinteză.

Poate să-şi mărească suprafața prin invaginare, formând sisteme de membrane care uneori se ramifică în citoplasmă. Funcționează ca o „barieră osmotică” dotată cu impermeabilitate cvasitotală față de unele tipuri de molecule, permițând trecerea nestânjenită a altora. Unele substanțe care sunt uşor solubile în solvenții lipidelor precum şi unii anioni (ex: Cl^-) traversează uşor biomembranele, pe când alți ioni (Na^+, K^+, glucidele, proteinele) nu o pot traversa tot atât de uşor, celula recurgând la mecanisme speciale de transport. Membrana este implicată în mobilitatea bacteriei datorită faptului că una din structurile corpului bazal al flagelilor intră în compoziția sa.

Participă la formarea şi eliminarea unor proteine cum ar fi enzimele şi exotoxinele care pot fi sintetizate în membrana citoplasmatică sau pe suprafața sa externă.

Membrana procariotelor constituie un sediu important pentru o serie de activități metabolice.

Reprezintă sediul unor enzime respiratorii (citocromoxidaze, dehidrogenaze, catalaze, ale reacțiilor de oxidoreducere).

Sistemele enzimatice situate în membrana celulară sintetizează de asemenea majoritatea precursorilor constituenților peretelui bacterian, fiind dirijată de polimeraze.

Structura membranei celulare reprezintă ținta acțiunii unor antibiotice. De exemplu, polimixina acționează asupra membranei celulare asigurând transferul precursorilor şi totodată o importantă modificare a permeabilității acesteia, ceea ce explică toxicitatea acestui antibiotic.

3.2.4.1. Mezozomii

Reprezintă amplificări ale membranei citoplasmatice rezultate din invaginarea şi plierea ei spre interior.

Acestea sunt pronunțate la bacteriile Gram pozitive şi mai greu de observat la bacteriile Gram negative din cauza dimensiunilor lor relativ mici.

Au fost descrise trei tipuri morfologice de mezozomi:

a) *lamelari* – formați prin plierea membranei invaginate într-un aranjament de spirală încolăcită ca un ghem;

b) *veziculari* sau *sacciformi* – formați din vezicule aproape sferice;

c) *tubulari* – de forma unor tubuşoare lungi;

După localizarea lor în membrană, mezozomii pot fi clasificați în trei categorii: septali, periferici şi nucleari.

Mezozomii prezintă caracteristicile structurale ale membranei citoplasmatice din care derivă şi anume: structură triplu stratificată şi o grosime de 7,5-8,0 nm.

Prin expunere în medii hipertonice, sunt extrudați în spațiul dintre membrană şi peretele celular sub forma unor filamente asemănătoare cu un „şirag de perle”.

Formarea mezozomilor se realizează inițial prin invaginarea membranei citoplasmatice, cu formarea unui sac sferic, care se conectează cu membrana printr-un peduncul deschis spre mediul extern (şi/sau spațiul periplasmic) şi sfârşeşte prin legarea de genomul bacterian. Acesta suferă în continuare modificări rezultate din diferite grade de turtire însoțite de invaginări secundare care duc la formarea de lacune, vezicule şi tubuli.

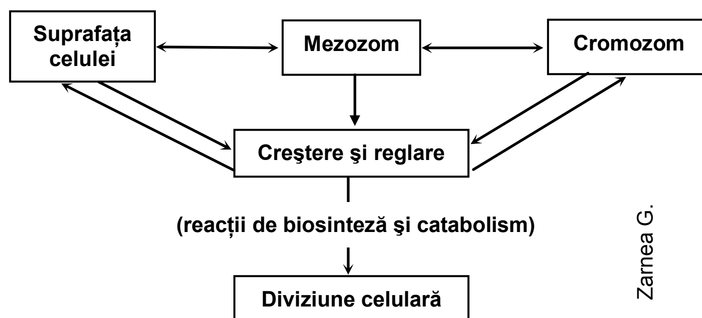
Concomitent cu creşterea în complexitate apare şi posibilitatea unui grad mai mare de compartimentare a componenților citoplasmatici care apar la microscopul electronic sub forma unor canale rezultate din invaginările secundare.

Prin intermediul mezozomilor celula bacteriană are posibilitatea de a-şi mări, prin invaginare şi pliere, suprafața membranei plasmatice, ca răspuns la condițiile de mediu. Au rol în replicarea şi segregarea genomului bacterian. Sunt considerați ca echivalenți funcționali ai mitocondriilor participând la reacțiile de fosforilare, oxidoreducere şi transport de electroni. Conțin fosfataze acide, esteraze, etc., funcționând ca „organite” subcelulare degradative, asimilabile cu lizozomii din celule eucariote. Au rol în producerea şi eliberarea unor enzime ca „penicilinaza”. Sunt implicați în sinteza învelişurilor celulare, în mod particular a membranei plasmatice, a peretelui celular şi a septului

transversal care separă celulele după diviziune.

Se presupune că mezozomii măresc suprafaţa internă disponibilă pentru funcţiile membranei, însă funcţiile lor reale constituie în continuare o problemă controversată.

Schema 3.2. Procesele de creştere şi diviziune în care participă mezozomii



3.3. Structura internă a celulei bacteriene

3.3.1. Protoplasma

În interiorul învelişului bacterian se află o soluţie gelatinoasă, densă, numită protoplasmă, care reprezintă un sediu important pentru activităţile biochimice şi de sinteză ale celulei. Componenta sa principală, apa (70-80%), serveşte ca dizolvant al unui amestec complex de substanţe nutritive, incluzând zaharuri, aminoacizi şi săruri, numit şi „pool" (rezervor) celular.

Componentele acestui rezervor servesc ca elemente de construcţie pentru sinteza celulară sau ca surse de energie.

De asemenea, protoplasma adăposteşte enzime metabolice şi mase distincte mai mari reprezentate de corpusculi cromatinici, ribozomi, mezozomi şi granule.

3.3.1.1. Citoplasma bacteriană

Citoplasma are consistenţa unui gel, neprezentând curenţi şi nici deplasări evidente ale elementelor componente.

La acest nivel coexistă stări de emulsie şi de soluţie caracterizându-se prin menţinerea permanentă a stării de gel, ceea ce are ca rezultat o imobilitate a conţinutului (lipsa curenţilor citoplasmatici). Acest lucru reprezintă condiţia indispensabilă a menţinerii nemiscibilităţii

nucleului cu citoplasma, având în vedere absența unor membrane intracelulare.

La celulele tinere citoplasma aderă la peretele celular ca o masă densă, omogenă şi intens colorabilă. La cele bătrâne, se retractă, îşi pierde afinitatea tinctorială şi capătă o structură granulară cu vacuole din ce în ce mai evidente prin microscopie electronică.

O caracteristică a citoplasmei bacteriene este prezența unei mari cantități de ARN, ceea ce explică bazofilia ei intensă. Această calitate este mai evidentă la celulele tinere.

3.1.2. Materialul genetic

Materialul genetic este format din materialul nuclear (genom) şi din plasmide (plasmon).

Prin definiție bacteriile nu au nucleu, adică ADN-ul lor nu este înconjurat de o membrană proprie, în schimb este agregat într-o zonă densă a celulei numită nucleoid, fiind constituit dintr-un singur cromozom.

Din punct de vedere morfologic, cromozomul constituie o masă compactă electronotransparentă constituită din ADN bicatenar pliat prin răsucire şi suprarăsucire având aproximativ aceeaşi formă cu celula bacteriană şi anume sferică, în cazul cocilor şi alungită în cazul bacililor.

El ocupă 5-16% din volumul celulei. ADN-ul depăşeşte de aproximativ 1000 de ori lungimea lineară a celulei bacteriene, dar este împachetat pentru a forma un corp cromatic de aproximativ 1500 de ori mai mic decât propria sa dimensiune în stare desfăşurată.

Materialul nuclear este localizat în mod obişnuit în partea centrală a celulei şi se prezintă ca o zonă mai clară decât citoplasma înconjurătoare, fiind alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN de formă circulară (extremitățile ei nu sunt libere, ci reunite).

Pettjohn şi Hecht, au elaborat un model, în care ADN-ul din cromozomul de *Escherichia coli* ar fi alcătuit dintr-o structură compactă, ca urmare a unui proces de pliere şi formare de superhelice în care structura condensată a ADN-ului este menținută de molecule de ARN care leagă şi stabilizează buclele de pliere.

Pentru a menține starea condensată a ADN-ului este necesară o sinteză continuă de ARN, fapt care explică asocierea ARN polimerazei.

Rouviere – Yaniv (1975) a izolat de la *E. coli* o proteină specifică, proteina HU, care este implicată în plierea ADN-ului în celulă. Este un polipeptid de aproximativ 9 Kdal, cu structură asemănătoare cu histonele prin bogăția în lizină şi alanină. Proteina HU determină plierea ADN-ului şi în cantități suficiente asigură aşezarea lui în anse în formă de ghirlande, foarte condensate. Bacteriile în mod normal sunt uninucleate, dar în

culturile tinere apar cu 2-4 cromozomi genetic identici deoarece provin din replicarea cromozomului parental. Când celula este în stare de repaus, viteza de replicare a materialului nuclear este proporțională cu viteza de creştere a celulei.

Examinat la microscopul electronic sau expus unor coloranți speciali, corpusculul cromatinic prezintă aspect granular sau fibros.

Deşi genomul reprezintă condiția minimă necesară pentru supraviețuirea bacteriană, multe specii conțin alte fragmente de ADN, numite plasmide. Plasmidele sunt molecule mai mici de ADN dublucatenar, independente de cromozom, caracteristice celulei procariote. Totalitatea materialului genetic plasmidic din celula bacteriană constituie plasmonul.

Pot fi considerați cromozomi miniaturali (minicromozomi). Mai pot fi desemnați şi cu denumirile de material genetic suplimentar, auxiliar sau extracromozomal. Reprezintă aproximativ 1% din mărimea cromozomului.

Aceste fragmente extracromozomale circulare minuscule conferă deseori bacteriilor caracteristici protectoare, cum ar fi rezistența la medicamente şi la radiații sau producerea de toxine şi enzime.

Deoarece plasmidele pot fi uşor manipulate în laborator şi transferate de la o celulă bacteriană la alta, reprezintă un element important în tehnicile moderne de inginerie genetică.

Funcția biologică a materialului genetic constă în determinarea caracterelor care definesc fiecare specie bacteriană, reprezentate de ereditate, arhitectură precum şi de capacitatea de evoluție a celulei bacteriene.

Ribozomii (Granulele lui Palade) sunt structuri granulare cu rol major în fiziologia celulei. Sunt particule nucleoproteinice intracitoplasmatice de formă aproximativ sferică cu diametrul de 20 nm. O celulă bacteriană conține mii de ribozomi (15.000-100.000/celulă) cu constanta de sedimentare 70S şi greutatea moleculară 3000 kDa, ce prezintă tendința de a disocia rapid în două subunități mai mici inegale, cu constantele de sedimentare 30S şi 50S. Ei sunt ataşați de membrana celulară şi de mezozomi.

Din punct de vedere chimic, un ribozom este o combinație de tip special de ARN, numit ARN ribozomal sau ARNr (aproximativ 60%) şi proteine (40%).

O metodă de caracterizare a ribozomilor este metoda de evaluare prin unități S a dimensiunilor moleculare ale diferitelor părți celulare care au fost separate pe baza greutății într-o centrifugă. Prin asocierea acestei metode cu o micografie electronică de înaltă rezoluție s-a demonstrat că ribozomul procariot, evaluat în general ca măsurând 70S, este în realitate

alcătuit din două subunități mai mici. Aşa numita subunitate 30 S are un aspect asemănător unei inimi, iar unitatea 50 S seamănă cu o coroană. Ele se unesc pentru a forma o platformă în miniatură pe care se efectuează sinteza proteinelor.

Vom examina în continuare mai în amănunt aceste două subunități din care sunt alcătuiți ribozomii.

Subunitatea mică – 30 S (g.m. 900.000 dal) este alcătuită din 21 molecule de proteine diferite, notate de la S_1 la S_{21} (small = mic) şi o moleculă de ARNr notată 16 S formată din aproximativ 16.000 nucleotide.

Este formată din trei regiuni:

- *cap* (o treime din subunitatea mică);
- *bază* (restul de două treimi);
- *platformă* – separată de cap printr-o scobitură numită *fisură* (despicătură, „cleft”).

Subunitatea mare – 50S (g.m. 1.600.000 dal) este alcătuită din 34 proteine diferite, notate convențional de la L_1 la L_{34} (large = mare).

Modelul de structură al subunității mari include o protuberanță centrală, flancată de câte o prelungire de fiecare parte, cea mai extinsă fiind numită, „peduncul”, iar cealaltă, „creastă” („ridge”), între ele găsindu-se o „vale”.

Când cele două subunități sunt asociate, pedunculul subunității mari are baza aproape de constricția de pe o subunitate mică, iar capul unei subunități mici şi protuberanța subunității mari sunt aproximativ aliniate.

S-a demonstrat că atât proteinele cât şi moleculele de ARN, ocupă poziții bine definite la suprafața ribozomilor, conferind în ansamblu subunității 50 S, o formă ce ar putea fi asemănată după unii autori cu o „coroană”, iar după alții cu un „fotoliu”.

Subunitatea 30 S a fost asemănată fie cu o „inimă”, fie cu o „halteră asimetrică” rezemată orizontal pe brațele şi spătarul fotoliului. Între cele două subunități (între scobitura fotoliului şi gâtul halterei) rămâne un canal lung şi îngust, prin care trece ARNm, purtător al informației genetice necesare pentru sinteza proteinelor.

Unii ribozomi se găsesc liberi în citoplasmă, în timp ce alții apar legați de fața internă a membranei citoplasmatice. O celulă de *E. coli* în plină creştere sintetizează circa 500 ribozomi/minut, acest proces implicând atât sinteza, cât şi asamblarea moleculelor.

Ribozomii sunt componente esențiale ale sistemului de traducere a informației genetice reprezentând adevărate „fabrici” de proteine. În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, ribozomii individuali au tendința de a se grupa în şiruri lineare.

3.3.1.2. Granule, incluzii

Majoritatea bacteriilor sunt expuse unor modificări severe ale disponibilității hranei. Pentru a echilibra această situație în perioadele abundente în substanțe nutritive, bacteriile pot forma, intracelular, depozite nutritive, în incluzii sau granule variabile ca dimensiune, număr şi conținut. Celula bacteriană poate mobiliza progresiv în funcție de cerințe, sursa de substanțe depozitate. Incluziile sunt constituite din substanțe organice condensate, bogate în energie, respectiv glicogen, amidon sau poli-β-hidroxibutirat (PHB) înconjurate de membrane speciale.

Granulele conțin de obicei cristale de compuşi anorganici şi nu sunt înconjurate de membrane.

Ca exemple, amintim granulele de sulf ale bacteriilor fotosintetizante, granulele de polifosfat ale bacteriilor din genul *Corynebacterium*, precum şi cele conținute de *Mycobacterium*. Acestea sunt frecvent denumite *granule metacromatice* deoarece se colorează cu o culoare de contrast (albastru de metilen) în violet.

Un tip unic de incluzii, găsit la unele specii de bacterii acvatice este reprezentat de veziculele cu aer care le conferă forță ascensională şi capacitate de plutire.

▪ *Incluziile de glicogen şi amidon* se prezintă sub forma unor mase cu diametrul de 50-100 nm, găsindu-se frecvent la bacilii sporogeni aerobi.

▪ *Incluziile de poli-β-hidroxibutirat – PHB* apar ca nişte granulații foarte refringente, cu diametrul de 100-500 nm, fiind delimitate la periferie de o membrană monostratificată electronotransparentă, groasă de 2 nm, derivată dintr-un strat al membranei plasmatice. Ele reprezintă rezerva celulară de carbon şi energie, caracteristică tuturor celulelor procariote.

▪ *Incluziile parasporale* se formează odată cu sporularea şi se datorează supraproducției de proteine a învelişului sporal şi depozitării lor intracelulare.

▪ *Incluziile de polifosfat anorganic* (polimetafosfat) formează prin depozitarea lor în citoplasmă structuri cunoscute sub denumirea de granule de *volutină* sau *corpusculii Babeş – Ernst.* Granulele de volutină acționează ca un mecanism de reglare a economiei fosforului în celulă, reprezentând o rezervă de fosfor şi energie intracelulară.

▪ *Granulele de sulf* se găsesc în cantități mari la bacteriile care se dezvoltă în medii bogate în hidrogen sulfurat şi reprezintă un depozit de rezervă, deoarece dispar prin oxidarea sulfului, dacă sunt transferate într-un mediu sărac în hidrogen sulfurat.

▪ *Vacuolele* sunt formațiuni sferice cu diametrul de 0,3-0,5 microni,

mai puțin refringente decât citoplasma, care apar în celula bacteriană în perioada ei de creştere activă.

Conțin diferite substanțe dizolvate în apă fiind înconjurate la periferie de un înveliş lipoproteic unistratificat numit *tonoplast*. Îndeplinesc rolul de reglatori ai presiunii osmotice în raport cu mediul extern sau de depozitare a substanțelor de rezervă, în perioada premergătoare formării incluziilor.

Bacteriile care conțin vacuole „umflate” cu gaze au o densitate globală mai mică decât apa şi de aceea plutesc la suprafața acesteia. Permit bacteriilor acvatice mobile să-şi modifice poziția într-o coloană verticală de apă, mai ales în lacurile stagnante.

▪ *Rhapidosomii* (gr. rhapidos = bastonaş, soma = corp) sunt particule ribonucleoproteice, de formă tubulară, identificate atât la bacteriile nepatogene cât şi la cele patogene (*Pseudomonas, Proteus*) cu semnificație biologică încă necunoscută.

▪ *Magnetosomii* sunt incluziuni care conțin fier sub formă de magnetită, întâlnite la unele bacterii acvatice. Prezența lor orientează deplasarea dirijată pe câmpuri magnetice a bacteriilor respective. Aceste incluzii acționează ca o busolă (biomagnetică), asigurând orientarea pozitivă şi deplasarea bacteriilor în câmpuri magnetice.

3.4. Endosporii bacterieni (rezistența în situații extreme)

Dovezi ample arată că anatomia bacteriilor le ajută să se adapteze destul de bine la habitate adverse. Dintre toate structurile microbiene însă, nici una nu poate fi comparată cu endosporul bacterian (sporul) în ceea ce priveşte rezistența în condiții ostile şi facilitarea supraviețuirii. Primele observații privind existența sporilor au fost făcute de către Pasteur (1865) şi Koch (1877). Endosporii sunt structuri dormante (în stare de latență) a unor specii bacteriene ce iau naştere în celula vegetativă prin formarea unui nou tip de celulă, cu structură, compoziție chimică şi enzimatică diferite, care îi conferă o rezistență deosebită la factorii de mediu. De obicei, într-o celulă vegetativă se formează un singur spor din care germinează o celulă vegetativă. Sunt produşi de membrii ai unor genuri de bacterii Gram pozitive, *Bacillus* şi *Clostridium*, dar şi de alte câteva genuri, fiind foarte rar întâlniți la coci (ex: *Sporosarcina ureae*). Reprezintă un caracter de specie cu mare valoare taxonomică în identificarea bacteriilor. În timp ce celula vegetativă este o entitate metabolic activă şi în creştere, endosporul se află într-o stare inertă, de repaus. Se caracterizează prin: absența activității metabolice; nu participă la procesul de diviziune al celulei (nu se multiplică); prezintă o intensitate redusă a funcțiilor vitale; prezintă rezistență crescută față de acțiunea

factorilor de mediu. Evidențierea sporilor în laborator se realizează prin metode directe, cum ar fi colorația cu verde de malachit sau indirecte prin colorația Gram.

Tabel 3.2.

Fenomene fizice şi chimice majore ale procesului de formare a endosporilor

Stadiu/Starea celulei	Proces/fenomen
Celula vegetativă	Reprezintă stadiul „0”, ce corespunde stării de celulă vegetativă la sfârşitul perioadei de creştere exponențială, care conține în mod normal doi nucleoizi complet separați spațial. Materialul nuclear devine mult mai dens
Celulă vegetativă în stadiu precoce	Celulă în stadiu precoce de formare al filamentului de cromatină (durata 0-1,5 h)
Celula vegetativă devine spo-rangiu în pregătire pentru pro-cesul de sporulare	Filamentul de cromatină se separă din nou în doi cromozomi dintre care unul migrează la o extremitate a celulei unde este închis într-un compartiment corespunzător viitorului spor prin invaginarea membranei plasmatice (ca un diafragm). Rezultă doi protoplaşti inegali (celula mamă şi presporul) care sunt acoperiți de acelaşi perete celular. În compartimentul corespunzător celu-lei vegetative continuă sinteza de ADN şi de substanțe specifice acesteia în timp ce în cel al viitorului spor nu mai are loc replicarea ADN-ului formându-se substanțe specifice sporului. Acest protoplast sau miez al sporului conține structurile şi substanțele chimice necesare pentru dirijarea proceselor vitale. În acest timp sporangele sintetizează activ compuşii necesari pentru formarea sporilor. Acest stadiu durează 1,5-2,5 ore
Sporangiu	Protoplastul este ingerat de sporangiu pentru a facilita formarea straturilor protectoare în jurul său. Are loc formarea presporului liber în celula mamă, acoperit de o membrană dublă rezultată din creşterea membranei citoplasmatice a sporangiului. Durează de la 2,5 până la 4-5 ore
Sporangiu cu prespor. Formarea cortexului.	Un strat de peptidoglican special formează un cortex în jurul protoplastului sporal, denumit acum prespor. Se depune calciul şi acidul dipicolinic; miezul devine deshidratat şi metabolic inactiv. Durează 4,5-6 ore
Sporangiu cu prespor. Formarea învelişurilor sporale.	Se adaugă 3 învelişuri consistente şi impermeabile de proteine multiple prin depozitarea pe suprafața cortexului şi încorporarea de cisteină. Durează 6-7 ore
Spor matur	Sporul se îngroaşă iar rezistența la căldură este totală; sporangiul nu mai este funcțional şi începe să se deterioreze. Are loc „maturarea” sporului cu apariția refringenței şi a rezistenței. Citoplasma devine mult mai omogenă şi electronodensă. Durează 7-8 ore
Spor liber	Pierderea completă a sporangiului cu eliberarea sporului din celula mamă prin enzimele litice activate de maturarea sporului. Acesta poate rămâne inactiv (dormant) însă viabil mii de ani

Datorită refractibilității lor, pot fi bine vizualizați şi în preparate proaspete, în picătură suspendată. Caracteristicile sporilor, respectiv mărimea, forma şi poziția în celula vegetativă, sunt întrucâtva utile pentru identificarea unor specii bacteriene.

Termenul de „spor” poate avea mai multe utilizări în microbiologie. Este un termen generic care se referă la orice corpuscul minuscul asemănător unei celule, produs de structuri vegetative sau reproductive ale unor microorganisme. Sporii pot fi extrem de variabili ca origine, formă şi funcții. Tipul bacterian este un endospor, deoarece este

produs în interiorul unei celule. Are rol în supravieţuirea celulei, dar nu şi în reproducerea acesteia, deoarece nici diviziunea celulară şi nici creşterea numărului de celule nu sunt implicate în formarea sa.

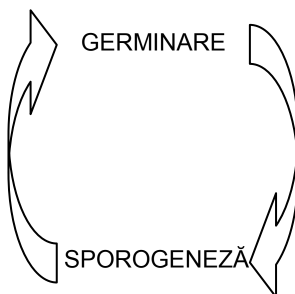
În schimb, fungii produc multe tipuri diferite de spori, cu rol atât în supravieţuire cât şi în reproducere.

Lipsa unor surse nutritive, în special carbon şi azot, reprezintă un stimul pentru ca o celulă vegetativă să sporuleze. Odată ce acest stimul a fost primit de către celula vegetativă aceasta se va transforma într-o celulă formatoare de spor numită *sporangiu*. Transformarea completă a unei celule vegetative într-un sporangiu şi apoi într-un spor necesită 6-8 ore la majoritatea speciilor sporogene.

3.4.1. Germinarea sporilor

După ce se află într-o stare de inactivitate, în decursul unor perioade variabile de timp, sporii pot fi revitalizaţi dacă apar condiţii favorabile. Întreruperea inactivităţii (stării dormante) şi revenirea la starea de celulă vegetativă poartă denumirea de *germinare*. Se produce în prezenţa apei şi a unui stimul specific din mediul înconjurător denumit agent de germinare. Odată iniţiat acest proces avansează rapid terminându-se în aproximativ 1½ h. Deşi agentul de germinare specific variază de la o specie la alta, acesta este în general reprezentat de o moleculă organică mică, ca de exemplu un aminoacid sau o sare anorganică.

Acest agent stimulează formarea de enzime hidrolitice (digestive) de către membranele sporului, care digeră cortexul expunând „inima" („core") acestuia, în momentul contactului cu apa. Se rehidratează şi captează substanţele nutritive începând să iasă din învelişurile sporale. Cu timpul redevine celulă activă metabolic reluându-şi ciclul vegetativ.



Fazele germinării:

1. *Faza de activare (inițierea germinării).*

Odată cu schimbarea condițiilor de mediu, se produc modificări în structura sporului care îi permit acestuia să răspundă la stimulii de germinare. În această fază se produce modificarea cortexului, umflarea şi alungirea sporului, pierderea refringenței şi eliberarea unor substanțe de origine sporală în mediu (peptide, dipicolinat de calciu, peptidoglican).

2. Germinarea propriu-zisă este declanşată de expunerea sporilor activați la stimulenți specifici (glucoză, acizi aminați, nucleozide etc.). În cursul germinării stadiul de latență încetează, activitatea metabolică creşte, iar rezistența la agenții fizici şi chimici (căldură, refringență, impermeabilitate față de coloranți) dispare. Învelişul sporal (*B. cereus*, *B. mycoides*) se lizează sau se dezintegrează mecanic (*B. subtilis*).

3. Creşterea are loc prin distrugerea învelişurilor sporale şi ieşirea unei noi bacterii, proces ce se realizează prin sinteza de *novo* a proteinelor şi a constituenților structurali ai celulei vegetative.

Germinarea se consideră încheiată în momentul reluării multiplicării.

Atât procesul de sporogeneză cât şi cel de germinare se găsesc sub controlul a aproximativ 50 de gene situate în loci diferiți pe cromozom. Controlul sporulării se realizează la nivelul transcrierii informației genetice şi la nivelul traducerii acesteia.

Factorii de mediu exercită un rol activant sau inhibant asupra procesului de sporogeneză şi a celui de germinare. De exemplu, sporularea are loc numai în anumite limite de temperatură (18-40^{o}C). De asemenea, este influențată de uscăciune, prezența oxigenului sau a bioxidului de carbon precum şi o anumită densitate a germenilor pe unitatea de volum.

Germinarea este influențată în sens pozitiv de temperatură, umiditate, şoc termic (încălzire bruscă la 60-80^{o}C), pH 6-8, substanțe chimice (glucoză, aminoacizi, ioni de sodiu, potasiu, calciu).

Factorii care inhibă germinarea sunt reprezentați de: apă distilată, glicerină, unele antibiotice (de exemplu: laterosporinele).



Controlul genetic al sporogenezei este corelat la unele specii bacteriene, cu sinteza de antibiotice (de exemplu: polimixina este sintetizată de *B. brevis*, bacitracina de către *B. licheniformis*) sau enzime (de exemplu: proteaze).

Se constată că există o proporționalitate directă între intensitatea sporogenezei şi cantitatea de antibiotice produsă. Mutantele incapabile să producă aceste substanțe sunt aproape invariabil asporogene.

3.4.2. Structura endosporului bacterian

Sporul se deosebeşte de celula vegetativă prin constantele sale morfologice cât şi prin structură şi afinitate tinctorială. Forma sa este în general ovală (excepție face, de exemplu *Clostridium tetani* care produce spor sferic), dimensiunile de 1,5-2 microni în lungime şi 0,5-1,2 microni diametrul transversal, volumul fiind mai redus decât cel al celulei vegetative.

Structura sporului este mai puțin densă decât a celulei vegetative deoarece constituenții celulari se găsesc într-o formă mai concentrată.

Părțile constitutive ale sporului bacterian din interior spre exterior sunt următoarele:

- *Inima sporului* („core", „sâmbure"), reprezintă celula sporală propriu-zisă care este acoperită de un perete. Este formată din sporoplasmă şi nucleoplasmă. Sporoplasma este echivalentă citoplasmei şi conține granule ce corespund ribozomilor. Este mai densă decât citoplasma. Nucleoplasma corespunde materialului nuclear format din ADN.
- *Membrana internă* (intina) corespunde membranei citoplasmatice şi delimitează sporoplasma. Uneori poate forma şi mezozomi.
- *Cortexul* este un strat gros cu grad redus de opacitate electronooptică constituit din peptidoglicani modificați.
- *Învelişul extern* (exina) este format din tunicile sporale care au o structură plurilamelară. La *B. cereus* prin tehnica de înghețare-fracturare se evidențiază următoarele straturi de la interior spre exterior: membrana externă a presporului (limitrofă cortexului); stratul de sub înveliş; stratul cu scobituri; stratul peticelor încrucişate.
- *Exosporiumul* reprezintă un înveliş suplimentar analog capsulei celulei vegetative care e prezent numai la anumite specii bacteriene (de exemplu: *B. cereus, B. anthracis*). Acest înveliş poate adera intim la învelişul extern sau poate avea caracterul unei anvelope laxe.
- *Apendicii* sunt nişte expansiuni situate la o extremitate a endosporului sub forma unui smoc, fiind de 2-3 ori mai lungi decât lungimea acestuia. Aspectul acestor structuri se aseamănă cu nişte tuburi turtite sau pene de pasăre. Se pare că rolul lor ar fi acela de a disemina sporii în natură, ajutând, de asemenea, la nutriția acestora.
- *Corpii parasporali* sunt formațiuni cristaloide dispuse pe suprafața endosporilor la anumite specii bacteriene, ca de exemplu la *B. subtilis* sau *B. megatherium*. Afinitatea tinctorială este diferită de cea a

celulei vegetative.

Raporturile anatomice între spor şi sporangiu.

În frotiurile efectuate din culturi bacteriene, sporii apar fie liberi, fie ataşaţi sau integraţi în celula vegetativă în interiorul căreia s-au format.

În funcție de raportul dintre diametrul transversal al sporului față de cel al sporangiului, pot apărea două situații:

- Diametrul sporului poate depăşi diametrul celulei vegetative, aceasta din urmă apărând deformată;
- Diametrul sporului apare mai mic decât cel al celulei vegetative care apare nedeformată.

După poziția sporului în raport cu axul longitudinal al sporangiului pot exista patru situații:

- Spor dispus central, la mijlocul axului longitudinal al celulei vegetative;
- Spor dispus subterminal, situat către una dintre extremități;
- Spor terminal, aflat la una din extremități;
- Spor lateral, situat central sau asimetric în raport cu grosimea bacteriei.

În funcție de ambele categorii de raporturi bacteriile sporogene, pot adopta diferite forme, cu semnificație taxonomică:

- Bacil nedeformat cu spor dispus central (de exemplu: sporii bacteriilor din genul *Bacillus*);
- Bacil deformat sub formă de „lămâie", cu spor central, formă ovală şi cu diametrul transversal mai mare decât cel al celulei vegetative (de exemplu: sporii bacteriilor din genul *Clostridium*);
- Bacil deformat sub formă de sticlă de „lampă de petrol" sau „bărcuță" dispus subterminal, cu spor oval (de exemplu: sporii bacteriilor din genul *Clostridium*);
- Bacil deformat sub formă de „rachetă de tenis", „ac de sau gămălie", „instrument de bătut toba" cu spor sferic, situat terminal (de exemplu: sporii formați de *C. tetani*);
- Bacil de forma asimetrică, excentrică, cu sporul situat pe o singură latură a celulei vegetative (de exemplu: sporul lateral de la *B. laterosporus*).

3.4.3. Particularitățile chimice, fiziologice şi biologice ale endosporului

Endosporii bacterieni sunt cele mai rezistente forme de viață capabile să supraviețuiască unor condiții extreme de căldură, uscăciune, frig, radiații sau unele substanțe chimice care ar omorî rapid celulele

vegetative.

Supraviețuirea lor în condiții atât de aspre se datorează mai multor factori:

▪ Spre deosebire de celula vegetativă sporii nu conțin incluzii de poli-β-hidroxibutirat, enzimele ciclului Krebs, unii transportori de electroni din membrană, în schimb, conțin proteine structurale şi enzime litice proprii.

▪ În plus, deoarece sporul are un conținut redus în apă liberă, săruri de fosfor, potasiu, acizi nucleici, el este şi metabolic inactiv fiind foarte rezistent la uscăciune. Din acest motiv ei pot rămâne viabili o perioadă îndelungată în diferite materii aflate în stare uscată.

▪ Rezistența mare a sporilor la diferite substanțe chimice şi la radiații, se datorează într-o oarecare măsură şi scoarței groase şi impermeabile a învelişurilor sporale. Dintre acestea putem menționa următoarele: diferite antibiotice (puțin active), alcoolul şi cloroformul (total inactive față de spori), iar glicerina prezintă chiar o acțiune conservantă asupra sporilor. Acest fapt prezintă importanță în practica preparării unor vaccinuri (de exemplu: stabilizarea suspensiilor de spori în cazul vaccinului anticărbunos).

▪ Longevitatea sporilor este bine dovedită. Într-un raport, este descrisă izolarea unor spori viabili dintr-un specimen arheologic vechi de 3000 ani.

▪ Condițiile de mediu sunt foarte importante în rezistența sporilor. De exemplu, sporii formați în prezența ionilor de calciu sunt mai rezistenți decât cei formați în absența acestora.

▪ Rezistența la căldură a endosporilor a fost pusă în legătură cu conținutul lor mare de calciu şi acid dipicolinic, deşi rolul exact al acestor substanțe chimice nu este încă pe deplin elucidat. S-a demonstrat că există un raport direct între cantitatea de acid dipicolinic şi gradul de termorezistență al endosporilor. Ştim că, de exemplu, căldura distruge celulele prin inactivarea proteinelor şi a ADN-ului şi că acest proces cere un anumit conținut de apă în protoplasmă. Deoarece depunerea de dipicolinat de calciu în spor îndepărtează apa şi lasă sporul foarte deshidratat, acesta va fi mai puțin vulnerabil la efectul căldurii.

Sporii rezistă câteva ore la 180^{o}C, căldură umedă, iar la 115-120^{o}C, căldură uscată, câteva minute.

Gradul de termorezistență al sporilor depinde de următorii factori:

➢ Specia bacteriană. Sporii unor specii sunt mai rezistenți la căldură decât cei ai altor specii bacteriene. De exemplu, sporii de *B. subtilis* sunt mai rezistenți decât cei de *B. anthracis*;

➢ Biotipul. În cadrul aceleiaşi specii există diferențe de rezistență între biotipuri. De exemplu, sporii de *C. perfringens*, tipul E, sunt mai

rezistenți decât cei din tipurile C şi D.

3.4.4. Semnificația biomedicală a endosporilor bacterieni

Majoritatea bacteriilor formatoare de spori sunt „locuitori” relativ inofensivi ai organismelor vii şi nu produc infecții bacteriene caracterizându-se printr-o existență saprofită.

Cu toate acestea, există mulți agenți bacterieni patogeni sporogeni. Nişa lor ecologică este reprezentată de sol. În majoritatea cazurilor, de aici, ajung în organism unde pot să producă infecții grave cum ar fi:

- **Antraxul** produs de *Bacillus anthracis,* care este o infecție cutanată, pulmonară sau digestivă a animalelor şi a omului;
- **Tetanosul** produs de *Clostridium tetani* sau alte infecții anaerobe produse de agenții gangrenelor gazoase.

Când sporii acestor specii ajung la nivelul unei plăgi profunde (cu țesut mort), creându-se condiții de anaerobioză, ele pot germina, creşte şi forma toxine puternice.

O toxiinfecție alimentară gravă este botulismul produs de *Clostridium botulinum*.

De asemenea, infecții cum ar fi, cărbunele emfizematos sau majoritatea anaerobiozelor sunt produse tot de specii sporogene din genul *Clostridium*.

Sporii constituie, de asemenea, şi o problemă permanentă a contactului microbian. Deoarece prezintă o rezistență foarte mare în sol şi în praf, ei pot fi uşor transportați în diferite habitate umane şi animale.

Prezintă o rezistență sporită la substanțele de curățire uzuale cum ar fi, apă clocotită, săpunuri şi dezinfectante. Pot constitui o problemă în laboratoarele de microbiologie deoarece contaminează frecvent mediile de cultură.

Spitalele şi clinicile trebuie să-şi ia măsuri de precauție pentru protejarea împotriva efectelor nocive, potențiale, pe care le pot provoca la nivelul diferitelor plăgi.

Distrugerea sporilor reprezintă o preocupare specială în industria conservelor alimentare (de exemplu: s-au găsit spori de bacterii saprofite în conserve de 114 ani), deoarece sporii germinați pot altera sau contamina (*C. botulinum*) alimentele. Pentru distrugerea sporilor trebuiesc utilizate metode energice.

3.5. Spectrul tipurilor bacteriene

Majoritatea bacteriilor funcționează ca organisme unicelulare independente. Deşi este adevărat că celulele bacteriene trăiesc asociate

unele cu altele formând colonii, fiecare în parte este pe deplin capabilă să execute toate activitățile vitale necesare ca, reproducerea, procesele metabolice şi prelucrarea substanțelor nutritive (spre deosebire de celulele mai specializate ale organismelor pluricelulare).

3.5.1. Formă, mod de grupare (aranjament) şi dimensiuni

Deşi, un studiu al regnului bacterian evidențiază o diversitate considerabilă de forme, majoritatea bacteriilor prezintă una dintre cele trei forme generale, în funcție de configurația peretelui celular. Examinate prin tehnici clasice de colorare, aceste celule au, mai degrabă, un aspect bidimensional (plat), însă cel mai bine pot fi vizualizate la microscopul electronic, care scoate în evidență caracterul lor tridimensional. Forma bacteriilor este controlată genetic.

Deşi, variază destul de mult, în funcție de condițiile de mediu, polimorfismul este limitat şi se caracterizează prin predominanța formei tipice pentru specia dată. Forma bacteriilor se apreciază în condiții artificiale, de laborator, fiind influențată de vârsta culturii, de compoziția mediului, de temperatură, pH etc. Pentru aprecierea corectă a formei, celulele trebuie să provină din culturi tinere, în faza de creştere activă, exponențială şi să aibă condiții optime de cultivare. În culturile vechi sau necorespunzătoare cerințelor de cultivare, apar forme aberante (y, ramificate, filamentoase).

După formă, celulele bacteriene se pot grupa în următoarele categorii:

A. **Formele principale**, reprezentate de:

- *coci* (bacterii sferice), cu perete celular sferic sau în formă de minge, diametrele celulei fiind aproximativ egale. Cocii pot fi sfere perfecte (stafilococii, majoritatea streptococilor), ovalari (enterococul), lanceolați – „flacără de lumânare" (pneumococul), reniformi – „boabă de cafea" (gonococul, meningococul);

- *bacili* (bacterii cilindrice), care sunt mult mai lungi decât lați, descriindu-se o lungime şi o grosime. Bacilii pot fi drepți sau uşor încurbați la mijloc, cu capetele tăiate drept, ca la *Bacillus anthracis* sau rotunjite, ca la *Bacillus cereus*. Marginile laterale ale celulei sunt de obicei paralele dar pot fi şi apropiate la extremități, în formă de *suveică* (*Fusobacterium, Lactobacillus)* sau îndepărtate şi rotunjite la una sau la ambele extremități, în formă de *măciucă, halteră* sau *pişcot* (*Corynebacterium*), dar pot fi şi inegal calibrați, luând aspect granular (bacilul Koch).

B. **Formele intermediare** (între coci şi bacili), sunt reprezentate de:

- formă *cocoidă*, cu aspect de coc, uşor alungit;

- formă *cocobacilară*, cu aspect de bacil scurt, cu capetele rotunjite.

Sunt bacterii de talie mică (1-1,5μ lungime şi 0,4-0,8 μ în diametru), care în mod obişnuit nu formează agregate, dar uneori pot să apară grupate câte două sau în lanțuri scurte (de exemplu: familia *Enterobacteriaceae*).

Alte forme de bacterii (în afara celor principale şi a celor intermediare) sunt reprezentate de:

- *Vibrionul,* bastonaş încurbat, în formă de virgulă (cornişoare), caracteristic unor genuri cum ar fi: *Vibrio cholerae*, numit şi *Vibrio comma* (comma = virgulă), de dimensiuni mici (2-4/0,3-0,5μ), de obicei izolați, rareori câte 2-3 dispuşi cap la cap, precum şi, genul *Campylobacter* (campylo = curb).

- *Spirilul,* filament cu mai multe ture de spirală rigide. Sunt lungi de 5-10 μm şi groşi de 0,2-0,7μm. Sunt bacterii mobile, de obicei flagelate, lofotrich sau amfitrich (de exemplu: *Spirillum volutans* şi alte specii saprofite).

- *Spirochetul* este o bacterie filamentoasă lungă de 10-20μ, foarte subțire (0,1-0,3μ), cu spire strânse şi regulate, flexibile care se pot strânge sau relaxa (de exemplu: bacteriile din genurile *Borrelia, Treponema* şi *Leptospira*). Peretele celular, deşi conține glicopeptide, prezintă un anumit grad de flexibilitate, spre deosebire de bacteriile tipice, rigide.

Aparatul locomotor este reprezentat de un fascicul de fibrile contractile, fixate la cele două capete ale protoplastului. Protoplastul filamentos este înfăşurat în jurul fasciculului de fibrile, totul fiind acoperit de peretele bacterian. Fibrilele au aceleaşi proprietăți contractile ca şi flagelii bacteriilor tipice, dar prin poziția lor internă, ele asigură nu numai mobilitate, ci şi flexibilitate bacteriei.

- *Filamentul* are ca prototip actinomicetul, microorganism foarte asemănător cu fungii, având particularitatea de a forma hife, cu tendință de ramificare perpendiculară, *bacterii miceliene.*

Într-un stadiu mai avansat, filamentele se fragmentează în forme bacilare de lungimi diferite.

Este destul de obişnuit, ca celulele aceleiaşi specii, să difere în oarecare măsură ca formă şi dimensiune. Acest fenomen, numit pleomorfism (Gr. *pleon*, mai multe; Gr. *morph*, formă), se datorează variațiilor individuale ale peretelui celular, provocate de diferențe nutriționale sau de unele mici diferențe ereditare (de exemplu: celulele din genul *Corynebacterium* sunt în general considerate ca având formă de bastonaş, ele prezintă însă în cultură variații, cum ar fi formele de măciucă, umflată, curbată, filamentoasă sau cocoidă). Pleomorfismul atinge maximul la bacteriile din genul *Mycoplasma*, care sunt complet lipsite de pereți celulari şi ca atare prezintă variații extreme de formă.

Pe de altă parte, pleomorfismul, trebuie acceptat ca o însuşire care se manifestă cu diferite grade de intensitate, în funcție de tulpină şi de condițiile de mediu, la toate speciile bacteriene.

Gama tipurilor bacteriene părea în trecut mult mai simplă decât se dovedeşte a fi astăzi. De la mijlocul, până spre sfârşitul secolului al XIX-lea, majoritatea bacteriilor cunoscute puteau fi uşor reunite sub câteva denumiri generice. Bacteriile sferice erau incluse în genurile *Micrococcus, Streptococcus,* sau *Staphylococcus*, iar bacteriile în formă de bastonaşe erau încadrate fie în genul *Bacterium*, fie în genul *Bacillus*. Dacă acestea aveau forme de bastonaşe curbate erau încadrate în genul *Vibrio*, iar atunci când aveau forme spiralate erau clasificate fie în genul *Spirillum*, fie în genul *Spirochaeta*. Deoarece se cunoştea foarte puțin despre caracteristicile biochimice ale acestor bacterii, iar colorația Gram nu era încă folosită ca un mijloc general de clasificare, studiul morfologiei lor constituia metoda principală de identificare. Ca urmare, bacterii despre care ştim astăzi, că sunt foarte diferite, erau încadrate deseori în acelaşi gen (de exemplu: *Escherichia coli* era în trecut denumită *Bacterium coli, Pseudomonas aeruginosa* era denumită *Bacterium aeruginosa*, iar pentru *Streptococcus lactis* se folosea termenul de *Bacterium lactis*, deşi primele două bacterii sunt bacili, iar a treia este coc.

Schemele actuale de clasificare cuprind peste 1000 de genuri, iar identificarea bacteriilor se bazează pe sute de caracteristici. Deşi în prezent se cunosc peste 5000 de specii, în fiecare an se descoperă altele noi. Creşterea recentă a numărului de specii noi se datorează în parte perfecționării tehnicilor de identificare. Unii bacteriologi consideră că noi nu am făcut decât să „zgâriem” suprafața şi că mai rămân să fie descoperite miliarde de bacterii.

Unele nume generice de bacterii apar tipărite şi cu majuscule şi cu litere mici (obişnuite). De exemplu, termenul *Staphylococcus*, după cum arată aici, se referă la un gen deosebit de bacterii în formă de coci, cu un set special de caracteristici. Când denumirea nu apare nici cu majuscule şi nici cu litere mici (cursive), germenii fiind prezentați la plural, acesta reprezintă un mod general de a desemna membrii genului respectiv sau de a descrie un aranjament (dispoziție; mod de grupare) sau un tip celular. De exemplu, streptococi, micrococi, micobacterii sau pseudomonade. Tot astfel de exemple se pot da şi în cazul lui *Bacillus* şi *Spirillum* ce se referă la gen iar dacă acestea apar scrise cu litere mici (bacili; spirili) se referă la forme. Grupările specifice cocilor sunt reprezentate de:

- coci neagregați;
- tetradă;
- sarcină;
- stafilococ.

Cocii neagregați – sunt coci izolați ce se întâlnesc la toate bacteriile sferice indiferent de aşezarea caracteristică speciei.

Tetrada este o grupare formată din patru coci aşezați simetric, datorită diviziunii în două planuri perpendiculare şi persistenței alipirii timp de două generații. Acest aspect este rar întâlnit (de exemplu: *Micrococcus tetragenes*).

Sarcina este o grupare mai complexă, constituită din pachete cubice de 8, 16 sau mai multe celule. Aceste grupări diverse de coci reprezintă rezultatul diviziunii în trei sau mai multe planuri perpendiculare care se intersectează. După diviziune celulele fiice rezultate rămân ataşate. Este caracteristică genului *Sarcina* (*S. flava, S. aurantiaca*) sau *Sporosarcina ureae*.

Stafilococul este constituit din grămezi neregulate de coci dispuşi asemănător ciorchinilor de struguri (staphylos = strugure), datorită diviziunii în planuri neregulate şi a persistenței alipirii timp de mai multe generații. Acest tip de grupare este caracteristic genului *Staphylococcus*.

Grupările comune atât cocilor cât şi bacililor sunt reprezentate de:

- gruparea diplo
- gruparea strepto

Gruparea *diplo*, la care diviziunea se face după planuri succesive paralele, celulele rezultate rămânând câte două.

Gruparea diplo în cazul cocilor este caracteristică pentru *Streptococcus pneumoniae*.

Acesta are o formă lanceolată, grupându-se specific cu părțile ascuțite spre interior şi cele rotunjite spre exterior, astfel încât diametrele mari ale celor doi coci sunt în continuare, suprapunându-se axului mare al diplococului. În cazul bacteriilor din genul *Neisseria* (*N. gonorrhaeae, N. meningitidis*) diametrele lungi ale celor doi coci sunt paralele, agregatul luând aspectul a două boabe de cafea care se privesc prin fețele plane.

Bacilii se pot grupa fie câte doi, fie în linie dreaptă (de exemplu: *Klebsiella*), fie asemănător literei „V” (de exemplu: bacilul rujetului).

Gruparea *strepto* (streptos = lanț) apare când diviziunea se realizează după planuri succesive paralele, rezultând lanțuri de celule de lungimi variabile.

Lanțurile formate de coci se aseamănă cu un şirag de mărgele, purtând denumirea de streptococi (formați din patru până la sute de celule), iar cele formate de bacili, se numesc streptobacili fiind caracteristice speciilor din genul *Bacillus* (*B. anthracis*).

Grupările specifice bacililor sunt reprezentate de:

- palisadă
- litere chinezeşti
- filament

- forme ramificate

Gruparea *în palisadă (grilaj)* asemănătoare cu scândurile unui gard, dinții unui pieptene sau degetele de la mână, apare datorită faptului că celulele rămân apropiate şi paralele în sensul axului lor lung, aşezarea lor rezultând dintr-o mişcare de basculare a celulei fiice, având ca punct de sprijin peretele transvers recent separat.

Aranjamentul în palisadă se constituie când celulele unui lanț rămân ataşate, dar numai printr-o mică regiune tip „balama" la capete. Celulele tind să se plieze una pe cealaltă formând un şir şi fiind orientate latero-lateral. Reacția poate fi comparată cu comportarea unor vagoane de marfă ale unui tren intrat în derapare rezultând o grupare care se aseamănă întrucâtva cu o palisadă (gard alcătuit din țăruşi) (de exemplu: bacteriile din genul *Corynebacterium* sau cele din genul *Mycobacterium*, cum ar fi *Myb. leprae*).

Gruparea în *litere chinezeşti* sau *litere de tipar* (X, Y, V, N) este reprezentată de grămezi mici, compuse din 2-4 bacili aşezați neregulat, alăturați sau suprapuşi formând între ei unghiuri suprapuse, ca bețele de chibrit împrăştiate întâmplător pe o masă. De exemplu, bacteriile din genul *Corynebacterium* (*Cor. diphteriae*) sau cele din genul *Mycobacterium* (*Myb. tuberculosis*).

Filamentul reprezintă, de fapt, un plasmodiu, având loc multiplicarea citoplasmei şi a materialului nuclear fără constituirea peretelui celular şi a membranei citoplasmatice separatoare între celule.

De exemplu, unele bacterii din genul *Bacillus* cum ar fi *B. anthracis*.

Formele ramificate reprezintă tot plasmodii fiind caracteristice actinomicetelor.

Marea majoritate a bacililor nu formează însă agregate şi după fiecare diviziune celulele fiice se dezlipesc şi apar dispersate în câmpul microscopic (de exemplu: marele grup al enterobacteriaceelor).

În ceea ce privesc cauzele grupării bacteriilor după diviziune există câteva ipoteze:

- Diviziunea se realizează prin intermediul unui sept transversal care creşte centripet de pe suprafața internă a peretelui celular. La bacteriile care se separă după diviziune se presupune existența unui mecanism de scindare a septului în două foițe, în timp ce la altele acesta rămâne nedivizat, realizând unirea celulelor în grămezi sau lanțuri;
- În unele cazuri, septul transversal s-ar forma incomplet, astfel încât celulele rezultate din diviziune ar rămâne legate printr-o şuviță de citoplasmă care ar reprezenta o punte de legătură între cele două celule echivalentă plasmodesmei, pusă în evidență între celulele multor țesuturi vegetale şi animale;

- După Prévot, la unele specii de bacterii sferice, gruparea s-ar datora unei substanțe vâscoase, gomoase, sintetizată de celula bacteriană şi depusă pericelular, difuz pe toată suprafața celulei sau din contră localizat în anumite regiuni, determinând diferite tipuri de polarizare a celulelor: radiară simplă (diplococ), diametrală simplă (streptococ), biradiară (tetracoc), bidiametrală (sarcină), circumferențiară (stafilococ).
- În alte cazuri, gruparea după diviziune depinde de existența unor teci comune sau de existența unor substanțe de continuitate intercelulară a peretelui celular (*Streptococcus faecalis*). Bacteriile din genul *Sarcina* formează pachete (opt-câteva sute de celule) datorită existenței unui strat gros de 150-200 nm, format în totalitate sau în mare parte dintr-un material similar celulozei prezent pe suprafața externă a peretelui celular.

Dimensiunile bacteriilor. Dimensiunile bacteriilor sunt foarte mici, de ordinul micronilor fiind vizibile numai la microscop. Cocii au un diametru care variază între 0,5-3,0μ; bacilii au diametrul între 0,2-2,0μ şi o lungime între 0,5-20μ. Vibrionii şi spirilii au diametrul între 0,2-2,0μ şi o lungime între 0,5-100μ. Spirochetele au un diametru care se situează între 0,1-2,0μ şi o lungime între 0,5-250μ.

Cele mai mici bacterii sunt micoplasmele care au în diametru de 125-200 nm şi rickettsiile care prezintă însuşiri intermediare. Sub raportul dimensiunilor cele mai mici bacterii se suprapun virusurilor mari (*Poxvirus*), fiind vizibile la microscopul fotonic, iar cele mai mari depăşesc mărimea celor mai mici protiste eucariote.

Dintre bacteriile clasice, germenii din genurile *Brucella* şi *Pasteurella* au cele mai mici dimensiuni. Se pot considera bacterii mici, cele ale căror dimensiuni variază între 0,1 şi 2-3μ.

Bacteriile cele mai mari au o lungime ce variază între 10-15μ. Dintre acestea menționăm germenii din familia *Bacillaceae*.

Marea majoritate a bacteriilor au dimensiuni cuprinse între 2-10μ lungime, iar diametrul transversal variază între 0,2 şi 2-3μ.

În general, există o corelație între lungime şi diametrul transversal. De exemplu, germenii din genurile *Bacillus* şi *Clostridium* sunt cei mai lungi, dar şi cei mai groşi bacili. Există şi excepții, ca de exemplu, bacilul rujetului care deşi poate ajunge la 3-4μ lungime este în schimb cel mai fin bacil având o grosime de 0,2-0,4μ.

Capitolul 4
Microbiologia cărnurilor proaspete

Este general acceptat faptul că țesuturile interne ale vitelor sănătoase sunt indemne la bacterii în momentul sacrificării, presupunând că animalele nu se află într-o stare de epuizare. Când se examinează carnea de vită şi de pasăre proaspătă la nivel de comerț cu amănuntul, se constată contaminarea cu microorganisme variate ca număr şi ca tulpini. Principalele surse şi căi de transmitere ale microorganismelor din carnea proaspătă de vită şi de pasăre (cu accent special asupra cărnurilor roşii) sunt următoarele:

1. Cuțitul de sacrificare. După ce au fost sacrificate prin secționarea venei jugulare (tăuraşi) şi ridicate de membrele posterioare. Dacă cuțitul (cuțit special „stick knife”) nu este steril, microorganismele sunt antrenate în fluxul sanguin, prin intermediul căruia se pot răspândi în toată carcasa.

2. Pielea animalelor. Microorganismele de pe piele pot pătrunde în carcasă prin intermediul cuțitului de sacrificare, prin zonele în care s-a desprins părul sau prin suprafețele secționate recent. Unele dintre acestea pot fi transportate de aer, putând contamina carcasele jupuite.

3. Tractul gastrointestinal. Când are loc puncția conținutului intestinal, încărcătura masivă de microorganisme a acestuia poate fi depozitată pe suprafața carcaselor proaspăt prelucrate. În această privință, cea mai mare importanță o prezintă rumenul, care în mod tipic conține aproximativ 10^{10} bacterii per gram.

4. Mâinile manipulatorilor. Reprezintă o sursă de agenți patogeni umani pentru carnea proaspăt tăiată. Chiar dacă se poartă mănuşi, microorganismele dintr-o carcasă pot fi trecute pe altele.

5. Containerele. Este de aşteptat ca bucățile de carne tăiată, plasate în containere nesterile să se contamineze cu microorganisme. Acestea pot reprezenta potențiale surse primare de microorganisme pentru cărnurile tocate sau mărunțite.

6. Mediul de depozitare. Aerul circulant reprezintă o sursă importantă de microorganisme pentru suprafața tuturor animalelor sacrificate.

7. Limfonodurile. În cazul cărnurilor roşii, limfonodurile, care sunt de obicei înglobate în grăsime, conțin deseori un număr mare de bacterii. Dacă acestea sunt secționate sau adăugate la porțiuni care sunt mărunțite este de aşteptat ca această biotă să devină contaminantă.

În general, cele mai importante sunt containerele nesterile. Când mai multe mii de animale sunt tăiate şi manipulate într-o singură zi, în acelaşi

abator, există tendința ca biota de pe carcasele externe să se răspândească în câteva zile de la o carcasă la alta. Efectul practic al acestui fapt îl reprezintă posibilitatea de contaminarea a unor astfel de produse la nivel de comercializare cu amănuntul.

Produsele biochimice ce conduc la instalarea rigidității cadaverice. La sacrificarea unei vite, carcasa acesteia suferă o serie de modificări. Lawrie a discutat despre aceste procese în amănunt şi vor fi prezentate aici în formă schematică. Stadiile sacrificării unui animal sunt următoarele:

1. Încetează circulația: se pierde capacitatea de resintetizare a ATP-ului; datorită acestui fapt are loc combinarea actinei cu miozina, formând actomiozina, care duce la o rigiditate a muşchilor.

2. Aportul de oxigen este suprimat, având drept rezultat o diminuare a potențialului redox.

3. Aportul de vitamine şi antioxidanți încetează, având drept rezultat o dezvoltare lentă a râncezirii (putrezirii).

4. Încetează reglarea nervoasă şi hormonală, provocând scăderea temperaturii animalelor şi solidificarea grăsimii.

5. Încetează respirația, având loc oprirea sintezei de ATP.

6. Începe glicoliza, având ca rezultat transformarea a glicogenului în acid lactic, ceea ce scade pH-ul, de la aproximativ 7,4 la un nivel ultim de aproximativ 5,6. Această scădere a pH-ului inițiază denaturarea proteinelor, eliberând activitatea catepsinelor şi finalizează rigiditatea cadaverică. Denaturarea proteinelor este însoțită de un schimb de cationi bivalenți şi monovalenți pe proteinele din muşchi.

7. Sistemul reticuloendotelial încetează să-şi desfăşoare activitatea de curățire, ceea ce permite microorganismelor să se înmulțească necontrolat.

8. Are loc acumularea diverşilor metaboliți, ceea ce contribuie, de asemenea, la denaturarea proteinelor.

Aceste procese se desfăşoară între 24 şi 36 de ore, la temperaturile obişnuite la care se păstrează carnea de vită proaspăt tăiată (2-5°C). O parte din biota normală provine din limfonodurile proprii ale animalului, de pe cuțitul de exsangvinizare, de pe piele, din tractul intestinal, din praf, de pe mâinile manipulatorilor, de pe cuțitele de tranşare etc. După o depozitare prelungită la temperatura de refrigerare, începe alterarea de către microbi. În eventualitatea că temperaturile interne nu sunt reduse la 4°C, alterarea va fi provocată de bacterii din surse interne. Dintre acestea, principalele sunt *Clostridium perfringens* şi genurile din familia *Enterobacteriaceae*. Pe de altă parte, alterarea bacteriană a cărnii refrigerate are loc la suprafață, ceea ce reflectă surse externe ale biotei de alterare.

Biota din carne. Termenul de „biotă” este folosit în acest text, în loc de „floră”, ca referire generală la bacterii. Flora se referă la viața plantelor. Termenul de „floră bacteriană” datează din perioada când se considera că bacteriile ar fi plante primitive. Deoarece, bacteriile nu sunt plante se preferă în locul „florei”, termenul de „biotă” sau de „microbiotă bacteriană”. În general, biota reflectă mediile de tăiere şi de procesare menționate mai sus, bacteriile Gram negative fiind predominante. Dintre bacteriile Gram pozitive, cel mai frecvent se găsesc enterococii şi lactobacilii. Din cauza prezenței lor în toate mediile de procesare a cărnii este de aşteptat ca numărul mucegaiurilor să fie foarte mare, incluzând Penicillium, Mucor şi Cladosporium. Levurile care se găsesc frecvent în carnea de vită şi de pasăre sunt membrii ai genurilor Candida şi Rhodotorula.

Incidența/prevalența microorganismelor în cărnurile roşii proaspete. Plăcile de numărare aerobe (APC_S = aerobic plate counts), din carnea proaspăt tocată sunt considerate mai mari decât cele raportate în majoritatea statelor. Într-un studiu efectuat în SUA, privitor la 563 de probe de carne de vită crudă tocată, numărul mediu log^{10} pentru APC a fost de numai 3,90, iar pentru bacteriile coliforme, *Clostridium perfringens* şi *Staphylococcus aureus*, numerele respective au fost de 1,98, 1,83 şi 1,49. Nu este elucidat în ce măsură, aceste numere mai mici reflectă o tendință de scădere a bacteriilor din carnea proaspăt tocată sau a metodologiei de laborator. Timp de mai multe decenii carnea tocată s-a dovedit a conține un număr mai mare de microorganisme decât cea netocată (costițe, antricoate, cotlete), cauzele fiind următoarele:

1. carnea tocată din comerț este compusă din diferite părți secționate, care sunt manipulate excesiv, conținând în general niveluri ridicate de contaminare microbiană. Carnea mărunțită, sub formă de bucăți mari conține în general un număr mai mic de microbi.

2. Carnea tocată prezintă o suprafața mai mare de expunere, ceea ce explică biota crescută a acesteia. Trebuie amintit că, dimensiunea porțiunilor fiind redusă, suprafața totală creşte, având loc o mărire consecutivă a energiei de suprafață.

3. Această suprafața fiind mai mare favorizează creşterea bacteriilor aerobe, care reprezintă biota obişnuită de alterare la temperaturi joase.

4. În unele unități comerciale, dispozitivele de măcinare a cărnii, cuțitele de secționare şi ustensilele de depozitare sunt rareori curățite, atât de temeinic şi frecvent pe cât este necesar, pentru a preveni creşterea numărului de microbi. Aceasta poate fi ilustrată de datele obținute într-un studiu de bacteriologie dintr-o băcănie mare. Lama fierăstrăului de tăiat carne şi masa de secționare erau şterse imediat după ce erau curățate în trei ocazii diferite, cu următoarele rezultate medii: pe lama fierăstrăului există

un număr total de $\log_{10}/in^2$, un număr de 5,28 cu 2,3 coliformi, 3,64 enterococi, 1,60 stafilococi şi 3,69 micrococi; masa de secţionare a prezentat un număr mediu $\log_{10}/in^2$, un număr de 5,69 cu 2,04 coliformi, 3,77 enterococi, < 1,00 stafilococi şi 3,79 micrococi.

5. O bucată de carne contaminată masiv este suficientă pentru a contamina alte bucăţi, precum şi întregul lot, pe măsură ce trec prin dispozitivele de măcinare. Această porţiune de carne contaminată conţine, deseori ganglioni limfatici înglobaţi în grăsime. S-a dovedit că aceste organe conţin un număr mare de microorganisme, explicându-se astfel, faptul că în carnea de hamburger există un număr mai mare de microorganisme decât în carnea de vită tocată. În unele state, carnea de hamburger, poate conţine până la 30% grăsime, în timp ce carnea tocată nu conţine mai mult de 20% grăsime.

4.1. Bacteriile

Prevalenţa înaltă a enterococilor în carnea de vită a fost ilustrată într-un studiu efectuat în perioada 2001-2002, pe carnea de vită vândută cu amănuntul în statul Iowa. Din 255 de eşantioane de carne de porc, 247 (97%) au fost pozitive pentru aceste microorganisme, 54% din izolate, fiind *Enterococcus faecalis* şi 38% *Enterococcus faecium.* Din 262 de eşantioane de carne de vită, care conţineau enterococi, 65% din izolate au fost identificate ca *E. faecium*, 17% *E. faecalis* şi 14% *E. hirae*.

Membrii genurilor *Paenibacillus, Bacillus* şi *Clostridium* se găsesc în toate tipurile de cărnuri. Într-un studiu asupra incidenţei sporilor anaerobi de putrefacţie (PA – putrefactive anaerobe) în bucăţi de carne de porc conservată (pentru gustări), Steinkraus şi Ayres au constatat că aceste microorganisme apar în număr foarte redus, în general mai puţin de 1/g. Într-un studiu al incidenţei sporilor clostridiali din cărnuri, Greenberg şi alţii au găsit un număr mediu de spori anaerobi de putrefacţie per gram de 2,8 în 2.358 de probe de carne. Din cei 19.727 de spori anaerobi de putrefacţie izolaţi, numai unul a fost de *Clostridium botulinum*, fiind recuperat de la puii de găină. Numărul mare de probe de carne studiate de aceşti cercetători au fost reprezentate de carne de vită, porc şi pasăre, fiind obţinute din toate părţile SUA şi Canadei. Importanţa sporilor anaerobi de putrefacţie din carnea de vită se datorează problemelor întâlnite în distrugerea termică a acestei forme în industria conservelor.

Erysipelothrix rhusiopathiae a fost izolat din aproximativ 34% de probe de carne de porc, în Japonia şi din 4%-54% din probe de spate de porc, în Suedia. În carnea de porc s-au găsit diverse serotipuri, iar nouă au fost găsite în izolatele de carne de pui din Japonia. Aceşti cercetători au sugerat că puii de găină constituie un rezervor specific al speciilor de

Erysipelothrix pentru infecțiile umane.

Incidența lui *Clostridium perfringens* în diverse alimente în SUA a fost studiată de Strang şi colaboratorii. Ei au izolat acest microorganism din 16,4% de probe de carne crudă de vită, de pasăre şi de peşte; din condimente, 5%; din fructe şi legume 3,8%; din alimente congelate preparate în comerț 2,7%; din alimente preparate în gospodării 1,8%. În carnea de vită tocată, *C. perfringens* în cantitate de 100 sau mai puțin per gram a fost găsit în 87% din 95 de probe, în timp ce 45 din cele 95 (47%) de probe au conținut acest microorganism în niveluri < 1000/g. Într-un studiu efectuat în SUA, în perioada 2001-2002 pe 445 de probe de muşchi integral tocat şi emulsifiat din carne de porc, de vită şi de pasăre crude, s-a constatat că sporii de *C. perfringens* nu au depăşit 2,0 $\log_{10}$ fiind în medie de 1,56 $\log_{10}$ ufc/g.

Unii membrii ai familiei *Enterobacteriaceae* au fost găsiți în carnea proaspătă şi congelată de vită, porc etc.

Din 442 de probe de carne examinate de către Stiles, 86% au conținut bacterii enterice, toate cele 127 de probe de carne de vită măcinată fiind pozitive. Cel mai frecvent au fost implicate *Escherichia coli* biotipul I (29%), *Serratia liquefaciens* (17%) şi *Pantoea agglomerans* (12%). Un total de 721 de izolate (32%) au fost reprezentate de *Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae* şi *E. hafniae.* La examinarea a 702 alimente pentru coliformii fecali, numărul cel mai probabil de germeni (MPN = most probable numbers) reprezentând 10 categorii de alimente a fost găsit în 119 probe de carne de vită tocată, media geometrică obținându-se prin procedura AOAC (Association of Official Analytical Chemists) a fost de 59/g.

4.1.1. Escherichia coli (biotipul I).

Această bacterie se foloseşte cel mai frecvent ca indicator de sanitație a alimentelor proaspete. Un comitet internațional a subliniat ca este mult mai indicată testarea pentru microorganismele indicatoare decât pentru agenții patogeni specifici în evaluarea contaminării cărnii de vită.

Într-un studiu pe pateuri de carne de vită congelată, efectuat în SUA, APC-ul (aerobic plate count) a fost mai mic de 3,0 $\log_{10}$ UFC/g, iar coliformii şi *E. coli* biotipul I au fost sub 1,0 $\log_{10}$ UFC/g. Aceşti cercetători au observat o lipsă de corelație între numărul mic de *E. coli,* biotipul I şi *E. coli* O157:H7. Un studiu canadian a arătat că numărul bacililor coliformi şi *E. coli* recuperați de pe mese şi de pe banda transportoare, într-o unitate de procesare a cărnii a fost asemănător cu cel recuperat din bucățile de carne secționate de pe marginile laterale, ceea ce

a subliniat importanța aparaturii ca sursă a acestor microorganisme pentru porțiunile de carne tăiată.

4.1.2. Arcobacter spp. şi *Campylobacter spp.*

Aceste două genuri sunt strâns înrudite filogenetic şi nu este deloc surprinzător faptul că habitatul lor se află în carne. În general, speciile de *Arcobacter* par să fie mai frecvente printre păsările de curte, decât în produsele de carne roşie, iar acest lucru este valabil şi pentru speciile de *Campylobacter*. *A. butzleri* este frecvent şi a fost găsit pe toate cele 25 de carcase de pui examinate în Danemarca. *A. cryaerophilus* a fost recuperat din 13 dintre cele 25 de carcase, iar *A. skirrowii* numai din două.

4.1.3. Salmonella spp.

Ca şi în cazul speciilor *Arcobacter* şi *Campylobacter*, carnea de pasăre şi alte cărnuri reprezintă surse comune ale acestor microorganisme. Salmonelele au fost găsite în 9,1% din 109 pachete congelate cu cârnați (în Marea Britanie), în anul 2000. Unele au fost izolate din probe preparate la grătar. Dacă acestea au fost ținute pe grătar mai mult de 12 minute au atins temperaturi interne mai mari de 75°C, fiind negative pentru Salmonella. Nici una dintre probe nu a conținut *Campylobacter spp.*

Într-un alt studiu efectuat în SUA, in ecosistemul unor porci de consum, pe 8066 de probe s-au găsit salmonele în 83 de probe de porci, 54 de probe de pe podea, 32 probe de pe cizme, 6 muşte, 9 şoareci, 3 pisici şi 3 păsări. S-a observat că pisicile şi cizmele muncitorilor au constituit adăposturile ecologice cu conținutul cel mai mare de salmonele. Cele mai frecvente serotipuri constatate au fost *S. Derby, S. Agona, S. Warthington şi S. Uganda.*

Din 112 tulpini de *Salmonella* izolate dintr-o măcelărie de păsări din Spania în 1992, 77% au fost reprezentate de *S. Enteritidis.*

În Brazilia s-a întreprins un studiu în 60 de abatoare de păsări (< 200 păsări/zi), cu următoarele rezultate şi procente pozitive pentru *Salmonella*: carcase (42%), ustensile (23%), apă (71%); congelator şi frigider (71%).

În total, 41% din probe au conținut *Salmonella*, incluzând 17 serotipuri, dintre care cele mai frecvente au fost: *S. Enteritidis* (30%), *S. Albany şi S. Hadar* (12%).

4.1.4. Speciile de Listeria şi Yersinia.

Prevalența speciei *Lis. monocytogenes* variază larg între cărnurile roşii crude şi carnea de pasăre. Serotipurile găsite au fost 1/2a, 1/2c şi 4b.

Izolatele au reprezentat 14 tipuri diferite de PFGE (pulsed field gel electrophoresis = electroforeză în câmp pulsatil).

Carnea crudă de porc şi de pui au fost examinate pentru prezenţa speciilor de Yersinia şi în Mexic, iar 27% din probe au fost pozitive. Din 706 de izolate suspecte de Yersinia, 24 au fost confirmate ca fiind *Y. enterocolitica, Y. kristensenii, Y. intermedia* şi *Y. frederiksenii*. Într-un studiu de 43 de probe de carne de porc obţinute la un abator, 8 au conţinut următoarele specii de yersinii: *Y. enterocolitica, Y. intermedia, Y. kristensenii, Y. frederiksenii*. În Finlanda, 92% din 51 de probe de limbă şi 25% de probe de carne tocată au conţinut *Y. enterocolitica.* Prin folosirea PCR-ului şi a unor metode de cultură, < 98% din limbile de porc au fost pozitive, cel mai comun fiind biotipul IV. Din 31 de limbi de porc obţinute de la animalele sacrificate recent au fost izolate 21 de tulpini cu biotipul 0:8 şi 30 cu biotipul 0:6.

Într-un studiu efectuat pe cârnaţi turceşti uscaţi (sucuk) numarul de bacterii *Y. enterocolitica* a scăzut de la 5,0 la 1,8 $\log_{10}$ UFC/g, după 4 zile de fermentaţie şi la 0,5 $\log_{10}$ UFC/g, după 12 zile de uscare, fără adăugarea directă a bacteriilor lactice acide. Prin adăugarea lui *Lactobacillus sakei* şi *Pediococcus acidilactici* 7,0 $\log_{10}$ UFC/g, agentul patogen a fost redus la 0,5 $\log_{10}$ UFC/g, după 3 zile de fermentaţie, iar după 4 zile nu a mai fost detectat nici unul.

4.1.5. Tulpinile patogene de Escherichia coli.

S-au recoltat 256 de probe de carne de vită tocată şi fecale de vită din Seattle, unde în 1993 s-au produs epidemii prin consum de carne de vită tocată.

Dintre tulpinile de *E. coli* non – O157:H7 producătoare de Stx, izolate de către Brooks, serovarul predominant a fost O128:H2, care produce ambele toxine Stx. Nici o tulpină de *E. coli* O157:H7 nu a fost găsită în acest studiu, efectuat pe 218 probe.

În cursul procesului de afumare s-a obţinut o reducere a 5-log de *E. coli* O157:H7. Procesul de fermentare a durat 8 ore, la 26,7°C, apoi 24 de ore la 37,8°C şi în final 24 de ore la 43,3°C, toate fiind temperaturi interne. Materialul de pornire a avut un pH de 4,4 cu 4,0% NaCl şi conţinut redus de grăsime (10%-13%), fiind inoculat cu *E. coli* O157:H7 la un nivel de 7,5 la 7,9 $\log_{10}$ UFC/g.

4.2. Cărnuri tocate cu adaos de soia

Adăugarea de proteine de soia (făină de boabe de soia, proteină de soia texturizată), 10-30% la pateul de carne tocată este larg răspândită în

industria fast-food-ului. Studiul cel mai vechi si cel mai detaliat în acest sens este acela al lui Craven şi Mercuri, care au constatat că atunci când la carnea de vită sau de pui tocată s-a adăugat soia în proporţie de 10-30% APC_S al acestor produse a crescut comparativ cu martorii la care nu s-a adăugat aceasta, când ambele cărnuri au fost păstrate la 4°C, timp de 8-10 zile.

În timp ce bacteriile coliforme au crescut în amestecul de soia cu carne de vită, acest lucru nu s-a întâmplat şi în cazul amestecului de soia cu pasăre. În general APC_S este mai mare în cazul concentraţiei de soia 30%, decât în cazul celei de 10%. Într-un studiu, în care s-a folosit soia 25% cu carne de vită tocată, durata medie de alterare la 4°C pentru amestecul carne de vită – soia a fost de 5,3 zile, faţă de 7,5 zile pentru carnea de vită tocată fără adaos de soia. Într-un alt studiu în care s-au folosit proporţii de soia 10%, 20% şi 30%, APC-ul a crescut semnificativ în toate cele trei cazuri.

În ceea ce priveşte cantitatea microbiologică a produselor de soia, media geometrică a APC din 1226 de eşantioane de probă a unor produse cu adaos a fost de 1.500/g, cu numărul fungilor, coliformilor, *E. coli* şi *Staphylococcus aureus* de 25/g, 3/g, 3/g şi respectiv 10/g.

Nu este încă clar elucidată problema de ce bateriile se dezvoltă mai rapid în amestecuri de carne cu soia, decât în cele fără soia. Soia însăşi nu alterează biota iniţială, iar tipul general de alterare al amestecurilor de carne cu soia nu diferă de acela al martorilor cu carne integrală. Totuşi, o diferenţă care trebuie menţionată este valoarea uşor mai ridicată a pH-ului (0,3-0,4 unităţi) în produsele cu adaos de soia, iar acest fapt ar putea să explice rata de creştere mai rapidă. Această constatare a fost evaluată de către Harrison şi col. prin folosirea unor acizi organici, pentru scăderea pH-ului în amestecurile de soia şi carne de vită integrală. Prin adăugarea unor mici cantităţi dintr-o soluţie de acid acetic 5% la amestecul de 20%, alterarea a fost întârziată cu aproximativ 2 zile, faţă de cea a martorilor, dar nu toată activitatea inhibitoare a fost datorată numai scăderii pH-ului. În cazul unei proporţii de grăsime de 25% în carnea tocată, numărul bacteriilor nu a crescut proporţional cu acela din carnea de vită, la care s-a adăugat soia.

Este posibil ca proteina de soia să mărească suprafaţa amestecului de soia-carne, astfel încât să fie favorizată acţiunea bacteriilor aerobe de tipul celor care predomină în cărnuri la temperatura frigiderului.

4.3. Cărnuri dezosate mecanic (MDM = mechanically deboned meat)

Carnea dezosată mecanic este îndepărtată de pe oase cu ajutorul unor

maşini speciale. În cursul procesului de dezosare cantități mici de pulbere de oase devin o parte din produsul finit, iar în 1978, USDA (Departamentul de Agricultură al SUA) limitează cantitatea de os (pe baza conținutului de calciu) la nu mai mult de 0,75% (conținutul de calciu al cărnii fiind 0,01%).

MDM trebuie să conțină minimum 14% proteine şi nu mai mult de 30% grăsime. Diferența parametrilor dintre carnea dezosată mecanic şi cea procesată convențional, în ceea ce priveşte creşterea microbiană este pH-ul mai ridicat al primei categorii în mod tipic de 6,0-7,0. pH-ul crescut se datorează încorporării de măduvă în carnea dezosată mecanic.

Deşi, majoritatea studiilor privind MDM-ul au arătat că aceste produse nu diferă de cele obținute prin metodele convenționale, în unele cercetări, însă, s-au găsit cifre mai mari. Numărul coliformilor din produsele MDM comerciale s-a situat între 460-1100/g. Din 54 de probe examinate, şase au conținut salmonele, patru *C. perfringens¸* dar nici una nu a conținut *S. aureus.* APC-ul din pieptul de miel dezosat normal a fost de 680.000, în timp ce, în cazul pieptului de miel dezosat mecanic, APC-ul a fost de 650.000/g.

S-a constatat că probele comerciale de peşte dezosat mecanic conțin un număr de 10 ori mai mare de microorganisme decât peştele procesat prin metode convenționale. Într-un alt studiu efectuat în SUA s-a constatat că s-a produs o creştere mai rapidă a bacteriilor psihrofile, în carnea de vită dezosată mecanic, decât în cea slabă tocată.

Majoritatea studiilor au evidențiat absența speciei *S. aureus* în carnea dezosată mecanic. În general, numărul microorganismelor mezofile este puțin mai ridicat decât acela al microorganismelor psihrofile, existând tendința de a fi mai reduse organismele Gram negative.

Field a tras concluzia că, dacă se folosesc practici corecte de procesare, carnea dezosată mecanic nu trebuie să prezinte probleme microbiologice. La o concluzie asemănătoare a ajuns şi Froning, privind carnea dezosată de pasăre şi peşte.

4.4. Cărnuri prelucrate termic

În procesarea convențională a cărnurilor (procesare la rece) carcasele sunt refrigerate 24 de ore sau mai mult şi prelucrate în stare refrigerată (post rigor). Procesarea la cald implică tranşarea cărnurilor la 1-2 ore după sacrificare (pre rigor). În general, microbiologia celor două tipuri de prelucrare a cărnurilor (la cald şi la rece) este aceeaşi, dar s-au raportat unele diferențe. Unul dintre cele mai vechi studii, care a fost efectuat asupra jamboanelor prelucrate la cald relevă faptul că acestea conțin un număr semnificativ mai mare de APC (la 37°C), decât jamboanele

procesate la rece. Numărul mezofililor la 35°C a fost mai mare în bucățile de carne procesate la cald, față de cele procesate la rece, atât înainte, cât şi după depozitarea în pachete sub vid, la 2°C, timp de 20 de zile. Coliformii se pare că nu au fost afectați de procesarea la cald. Barbe a evaluat 19 perechi de jamboane (procesate la cald şi la rece), constatând că cele procesate la cald au conținut 200 bacterii per gram în timp ce cele procesate la rece au conținut 220 de bacterii per gram.

Într-un studiu pe carcase de bovine, procesate la cald, ținute la 16°C şi pe carcase procesate la rece, ținute la 2°C, până la 16 ore, după moarte, nu s-au constatat diferențe semnificative în ceea ce priveşte numărul microorganismelor mezofile şi psihotrofe. Atât carnea de vită procesată la cald, cât şi cea procesată la rece au conținut un număr mic de bacterii, dar după 14 zile, carnea procesată la cald a conținut un număr mai mare decât cea procesată la rece.

Aceşti cercetători au constatat că reglarea termică a cărnii procesate la cald în primele ore după refrigerare este critică, iar într-un studiu efectuat mai târziu s-a constatat că refrigerarea până la -21°C, în decurs de 3-9 ore a fost satisfăcătoare.

S-a constatat un număr semnificativ mai mare de microorganisme mezofile şi lipolitice în produsele de carne procesate la cald, decât în cele procesate la rece, dar nu s-au înregistrat diferențe semnificative la microorganismele psihotrofe.

Efectul pe care refrigerarea prelungită ar putea să-l aibă asupra biotei cărnii de vită, procesate la cald, la aproximativ 1 oră după sacrificare a fost studiat de către McMillin. Au fost refrigerate porțiuni de carne, timp de 1, 2, 4 şi 8 ore, după sacrificare, fiind apoi tocate sub formă de pateuri congelate şi examinate. Nu s-a observat o diferență semnificativă între acest produs ş produsul procesat la rece, în ceea ce priveşte numărul de coliformi, stafilococi şi mezofili. Un studiu asupra taxonomiei numerice a biotei din carnea de vită procesată la cald şi cea procesată la rece, atât în momentul procesării, cât şi după 14 zile de păstrare în vid la 2°C, nu a evidențiat diferențe statistice semnificative între numărul de microorganisme. Microorganismele frecvent întâlnite după depozitare pentru ambele produse au fost streptococii (cu cea mai mare probabilitate enterococii) şi lactobacilii, în timp ce în produsul procesat la cald (înainte de depozitare) au fost găsiți mai mulți stafilococi şi bacili. În general, însă, cele două produse au fost asemănătoare.

Friptura de miel restructurată, făcută din 10-30% MDM şi carnea de vită procesată la cald au fost examinate pentru încărcătura microbiologică şi s-a observat că, în general cele două produse nefierte au fost de calitate bună. Produsele nefierte au conținut sub $3,0x10^4$/g, cu un număr în general mai crescut în produsele cu cantități mari de MDM. În produsele cu

conținut peste 30% de MDM a fost prezent un număr mai mare de coliformi totali şi coliformi fecali, considerându-se că aceasta se datorează contaminării picioarelor şi regiunilor pelvine, în cursul sacrificării şi al eviscerării. În produsul nefiert (0,1 g) nu s-au detectat *S. aureus* şi *C. perfringens.* În probele de 25 grame nu s-au detectat nici *Yersinia enterocolitica*, nici *Campylobacter jejuni.* Prepararea a redus numărul de celule în toate produsele la sub 30/g.

O examinare sintetică a lucrărilor a 10 grupe de cercetători a fost efectuată de către Kotula, cu privire la efectul procesării la cald asupra microbiologiei cărnurilor, constatându-se că şase grupe nu au constatat nici un efect, trei au observat efecte limitate şi numai o grupă a găsit un număr mai mare. Kotula a tras concluzia că procesarea la cald în sine nu are nici un efect asupra microbilor. Procesarea la cald este deseori însoțită de o presurizare prerigor, constând în aplicarea a aproximativ 15.000 psi pentru 2 minute. Acest procedeu ameliorează culoarea muşchiului şi aspectul general, mărind frăgezimea. Se pare că nu are nici un efect asupra microbiotei.

4.5. Efectul stimulării electrice

Dacă temperatura unei carcase de vită scade la mai puțin de 10°C, înainte ca pH-ul carcasei să fie 5,9, carnea va rămâne tare. Stimularea electrică măreşte rata de scădere a pH-ului, prin accelerarea transferului glicerinei în acid lactic, eliminând astfel tăria cărnii. Prin această metodă se ataşează de carcasă un stimulator electric şi se aplică pulsații repetate câte 0,5-1,0 sau mai multe secunde la o diferență de potențial între electrozi de 400+V.

Un rezumat al constatărilor făcute de către cele 10 grupe de cercetători, cu privire la efectul stimulării electrice, asupra microbilor, a arătat că 6 grupe nu au constatat nici un efect, 2 grupe un efect slab, iar 2 un efect oarecare. Cărnurile studiate au inclus carnea de vită, miel, porc.

Printre cercetătorii care au constatat o reducere a APC-ului prin stimularea electrică au fost Ockerman şi Szezawinski.

Ultima constatare sugerează că ruptura membranelor lizozimice şi eliberarea consecutivă a unor enzime cateptice, care au însoțit stimularea electrică nu au afectat microorganismele. Frăgezirea asociată cu stimularea electrică a cărnurilor se presupune că este, cel puțin în parte, rezultatul distrucției lizozimice.

Într-un alt studiu, nu s-a observat o scădere semnificativă a microorganismelor de suprafață, dar a fost înregistrată o reducere semnificativă a acestora pe muşchiul fesier al carcaselor de vită. Aceşti cercetători au constatat că, cele mai sensibile la stimularea electrică, au

fost bacteriile Gram pozitive, urmate de cele Gram negative şi sporogene. Când au fost expuse unui tratament de 30 V, timp de 5 minute, în ser fiziologic sau în ser fiziologic tamponat cu fosfat, s-a produs o reducere de 5 cicluri logaritmice, în cazul bacteriilor *E. coli*, *Shewanella putrefaciens* şi *Pseudomonas fragi,* în timp ce în soluție peptonată 0,1% sau de sucroză 2,5 M, nu s-a produs în esență nici o modificare. Deci, stimularea electrică în sine, nu pare să exercite efecte măsurabile asupra biotei microbiene a cărnurilor procesate la cald.

Carnea pre rigor poate fi frăgezită prin tratarea la presiune mare, ca aplicarea de aproximativ 15.000 lb**/in^2, pentru câteva minute sau printr-un proces numit *Hidrodine***. Acesta frăgezeşte carnea de vită prin utilizarea unei mici cantități de exploziv, care generează o undă de şoc hidrodinamică în apă. Nu este clar dacă această operație afectează biota bacteriană, dar când este aplicată la 55-60 mega Pascal (M Pa) nu distruge infecțiozitatea lui *Trichinella spiralis* din carnea de porc.

4.6. Organe şi cărnuri diverse

Cărnurile menționate mai jos sunt reprezentate de: ficat, rinichi, inimă, limbă (şi altele) de origine bovină, porcină şi ovină. Ele diferă de părțile musculaturii somatice (scheletice) ale animalelor, printr-un pH şi un nivel de glicogen mai mari, în special în cazul ficatului. Limitele de pH ale ficatului proaspăt de bovine şi porc sunt cuprinse între 6,1 şi 6,5, iar în cazul rinichilor între 6,5 şi 7,0. Majoritatea cercetătorilor au găsit, în general, un număr mic de microorganisme în aceste produse, numărul celor de pe suprafață variind între $\log_{10}$ 1,69 şi 4,20/cm^2, pentru ficat şi rinichi, inimă şi limbă, proaspete. Biota inițială este compusă din coci Gram pozitivi, bacterii coryneforme, bacterii sporogene aerobe, *Moraxella-Acinetobacter* şi *Pseudomonas spp*. În studiile lui Hanna, cele trei grupe dominante de bacterii din ficat, rinichi şi inimă, proaspete, au fost reprezentate de micrococi, streptococi şi coryneformi.

Într-un alt studiu, numărul stafilococilor coagulază pozitivi, coliformilor şi a lui *C. perfringens*, s-a situat între $\log_{10}$ 0,9 şi $\log_{10}$ 1,37/cm^2 (salmonele nefiind găsite).

4.7. Alterarea microbiologică a cărnurilor roşii proaspete

Majoritatea studiilor, care se ocupă de alterarea cărnii au fost efectuate pe carnea de vită. Carnea de porc, miel sau vițel, precum şi alte cărnuri se presupune că se alterează într-un mod similar.

Cărnurile prezintă cel mai înalt grad de perisabilitate dintre toate

alimentele principale, deoarece cărnurile conțin din abundență toți nutrienții necesari pentru creşterea bacteriilor, levurilor şi mucegaiurilor.

În aproape toate cazurile se remarcă alterarea produsă de unul sau mai multe genuri caracteristice acesteia, pentru un anumit tip de produs de carne. De aceea, prezența microorganismelor mai variate, de pe cărnurile nealterate poate fi reprezentată de mediul inițial al produsului respectiv sau de contaminanții captați în cursul procesării, manipulării, împachetării şi păstrării acestuia. De aici, întrebarea, de ce numai câteva tipuri predomină în cărnurile alterate. Cărnurile proaspete (vită, miel, porc, pasăre, carnea marină, carnea procesată) prezintă valori ale pH-ului în limitele de creştere ale majorității microorganismelor.

Conținutul în nutrienți şi umiditatea sunt adecvate pentru a susține creşterea tuturor microorganismelor enumerate. Deşi PO/R (potențialul redox) al cărnurilor integrale este redus, valorile de oxidoreducere tind să fie mai ridicate, astfel încât microorganismele strict aerobe, facultativ anaerobe şi cele strict anaerobe, găsesc în general condiții adecvate pentru creştere.

Dintre parametrii extrinseci, temperatura de depozitare prezintă cel mai important în controlul tipurilor de microorganisme ce se dezvoltă pe cărnuri, deoarece aceste produse sunt păstrate în mod normal la temperatura de refrigerare. În esență, toate studiile privind alterarea cărnurilor, care au fost efectuate în ultimii 50 de ani, au fost axate pe produse păstrate la temperaturi joase.

Din carnea de vită alterată, integrală au fost izolate următoarele tipuri de mucegaiuri: Thamnidium, Mucor, Rhizopus, care produc aspectul de „whiskers” („mustăți”, „fire de păr”); Cladosporium, cauza obişnuită a „petelor negre”; Penicillium, care produce „petele verzi”; Sporotrichum şi Chrysosporium, răspunzătoare de „petele albe”. În general, mucegaiurile, nu cresc pe cărnuri, dacă temperatura este sub 5°C.

Printre genurile de levuri găsite pe carnea de vită alterată, în frigider, mai frecvente sunt Candida şi Rhodotorula, iar în carnea de vită tocată, predomină *C. lipolytica* şi *C. zeilanoides*.

Carnea de vită tocată sau hamburgerii sunt alterate exclusiv de către bacterii, genurile cele mai importante fiind: *Pseudomonas, Alcaligenes, Acinetobacter, Moraxella* şi *Aeromonas*. Cauza principală a alterării, o constituie în primul rând *Pseudomonas*, dar şi speciile din genurile *Acinetobacter-Moraxella*. Genul *Pseudomonas* a suferit în ultimii 70 de ani modificări serioase de taxonomie. Conform clasificării actuale genul *Pseudomonas* face parte din subclasa gamma a *Proteobacteriilor*, incluzând speciile: *Ps. fluorescens, Ps. fragi,* specia tip *Ps. aeruginosa şi altele.* Unele din speciile încadrate în trecut în acest gen au fost transferate în subclasa alfa a proteobacteriilor (*Brevundimonas, Devosia,*

Sphingomonas), în timp ce altele (*Acidovorax, Comamonas* şi *Telluria*) sunt azi incluse în subclasa beta. Rămâne să se stabilească unde este locul acestor genuri, printre microorganismele clasificate în trecut ca pseudomonade.

Un studiu al bacteriilor Gram negative din carnea de vită, miel, porc şi cârnaţi proaspeţi arată că majoritatea erau reprezentate de pseudomonade (231), urmate de cele din genul *Moraxella* (61) şi *Acinetobacter* (49). Pseudomonadele care alterează carnea la temperaturi joase, în general nu corespund speciilor menţionate în Manualul lui Bergey.

Studiile taxonomice numerice, efectuate de Shaw şi Latty, au dus la gruparea majorităţii izolatelor investigate, în 4 clase, pe baza testelor de utilizare a sursei de carbon. Din 787 de tulpini de *Pseudomonas* izolate din carne au fost identificate 89,7%; 49,6% fiind incluse în clasa 2, 24,9% în clasa 1 şi 11,1% în clasa 3. Microorganismele din clasele 1 şi 2 au fost nefluorescente, lecitinază negative, fiind asemănătoare speciei *Ps. fragi*, iar cele din clasa 3 au fost fluorescente şi gelatinoliză pozitive. Proporţia tulpinilor de *Ps. fluorescens,* biotipul I a fost reprezentată de 3,9%; biotipul III de 0,9%, iar specia *Ps. putida* a fost reprezentată de o singură tulpină.

Se ştie că bucăţile mari de carne (sferturi) de vită se alterează în profunzime, de obicei lângă os, în special lângă sacrum. Acest tip de alterare este deseori desemnat prin termenul de „degradare osoasă” sau „acrire”. Principalele bacterii implicate în acest tip de alterare sunt *Clostridium* şi *Enterococcus*.

Temperatura de incubare reprezintă principala cauză a faptului că, în cărnurile alterate se găsesc mai puţine genuri de bacterii, decât în carnea proaspătă.

Într-un studiu efectuat de către Ayres, în carnea de vită proaspătă tocată, s-au găsit 9 genuri bacteriene, în timp ce după alterare s-au izolat numai 4. Peste 80% din populaţia microbiană din carnea proaspătă a fost reprezentată de bacteriile cromogene, sporogene, levuri, mucegaiuri, în timp ce după alterare, s-au găsit numai bacterii necromogene şi bacili Gram negativi.

Deşi, s-a dovedit că unele bacterii pot creşte la temperaturi de refrigerare pe mediile de cultură, se pare că ele nu au capacitatea de a intra în competiţie cu succes, cu tipurile bacteriene care produc alterarea: *Pseudomonas* şi *Acinetobacter-Moraxella*.

Antricoatele sau cotletele se alterează de obicei la suprafaţă; dacă microorganismele de alterare sunt reprezentate de bacterii sau de mucegaiuri, acest lucru depinde de umiditatea existentă. Carnea tăiată recent şi păstrată la frigider în condiţiile unei umidităţi ridicate suferă

întotdeauna o alterare bacteriană. Principala caracteristică a acesteia o constituie mucilagiul, format pe suprafaţa alimentelor respective, în care se găsesc aproape întotdeauna microorganisme.

O valoare redox (O/R) relativ crescută, prezenţa umidităţii şi o temperatură scăzută favorizează dezvoltarea bacteriilor din genul *Pseudomonas*. Uneori, când nivelul de contaminare este redus pe suprafaţa bucăţilor de carne de vită, pot fi observate coloniile bacteriene. Stratul de mucilagiu conferă coalescenţa coloniilor de suprafaţă, fiind în mare măsură răspunzător de consistenţa vâscoasă a cărnurilor alterate. Ayres a demonstrat că detectarea mirosurilor se face atunci când numărul bacteriilor de suprafaţă este între log 7,0 şi log 7,5/cm^2, urmate de un mucilagiu detectabil, când numărul acestor bacterii se situează între $\log_{10}$ 7,5 şi log 8,0/cm^2.

Atunci când suprafaţa cărnii este prea uscată sau aceasta a fost tratată cu antibiotice (tetracicline) se vor dezvolta, în special, mucegaiurile.

Odată cu dezvoltarea bacteriilor pe cărnuri, mucegaiurile nu mai pot apărea. Acest lucru se explică prin faptul că bacteriile cresc mai repede decât mucegaiurile, consumând oxigenul de pe suprafaţă, fără de care, mucegaiurile nu se pot dezvolta. Creşterea vizibilă a mucegaiurilor pe carnea tocată de vită este inexistentă, cu excepţia cazurilor în care agenţii antibacterieni au fost folosiţi drept conservanţi sau carnea a fost congelată mult timp.

Dintre semnele incipiente ale alterării cărnii de vită se remarcă mirosurile neplăcute, urmate de viscozitate, care se manifestă prin formarea mucilagiului bacterian. „Slimele” bacteriene, care se formează pe carnea proaspătă, în cursul alterării acesteia în frigider sunt reprezentate de „biofilme” (peliculă biologică).

Acelaşi tip de alterare se produce şi în cărnurile tocate cu soia, însă rata de alterare este mai rapidă.

4.8. Mecanismul alterării

Alterarea cărnurilor la temperaturi joase este însoţită de producerea unor compuşi de culoare anormală, ca amoniac, hidrogen sulfurat, indol şi amine. Metodele fizice şi cele bacteriologice directe arată că probele de carne alterate îşi schimbă caracteristicile organoleptice (miros, consistenţă, aspect şi gust). Pentru a prevedea, însă, alterarea sau perioada de valabilitate, se cere efectuarea unui test de prospeţime al cărnii.

S-a investigat utilizarea lor, ca indicatori de calitate ai cărnii de vită, împachetată sub vid, păstrată la 1°C, pe o durată de 8 săptămâni. Cadaverina a crescut mai mult decât putresceina. În cazul cărnurilor păstrate în condiţii aerobe, se întâmplă invers. Nivelurile cadaverinei, după

perioada de incubare au fost de 10 ori mai ridicate, decât cele inițiale, numărul total de microorganisme viabile, fiind de $10^6/cm^2$, în timp ce putresceina nu a prezentat decât o modificare redusă la acest nivel. În ansamblu, constatările au sugerat că aceste diamine ar putea fi prețioase pentru carnea împachetată sub vid. În carnea proaspătă de vită, de porc şi de miel, putresceina era prezentă la niveluri de la 0,4 la 2,3 ppm, iar cadaverina la niveluri de la 0,1 la 1,3 ppm. Putresceina reprezintă principala diamină produsă de pseudomonade, în timp ce cadaverina este produsă mai mult de *Enterobacteriaceae*.

Modificări importante ale cadaverinei şi putresceinei au loc în carnea de vită, atunci când APC depăşeşte aproximativ $4x10^7$, ceea ce ridică unele semne de întrebare, în ceea ce priveşte utilizarea lor ca indicatori ai alterării cărnii. Aceasta reprezintă o problemă a majorității metaboliților, deoarece producerea şi concentrația lor tind să fie legate de microorganismele specifice. Într-un studiu, modificările histaminei şi tiraminei din carnea de porc şi de vită au fost prea mici pentru a constitui factori de previziune a alterării, dar putresceina din carnea de vită şi cadaverina din carnea de porc au prezentat modificări din ce în ce mai mari pe măsura alterării.

Tehnica ERV (extract-release volume = tehnica volumului de eliberare a extractului), prima dată descrisă în 1964, s-a dovedit a fi valoroasă în determinarea alterării incipiente a cărnii, precum şi ca factor de previziune a valabilității cărnii congelate. Tehnica se bazează pe volumul de extract apos eliberat de un omogenat de vită, când este lăsat să treacă prin hârtie de filtru, în decursul unei perioade date de timp.

Astfel, carnea de vită, de calitate organoleptică şi microbiologică bune, eliberează valori mari de extract, în timp ce, carnea de vită de calitate microbiologică redusă eliberează cantități mai mici sau deloc. Unul dintre cele mai importante aspecte ale metodei este informația pe care a oferit-o cu privire la mecanismul alterării cărnii de vită la temperaturi joase.

Metoda ERV evidențiază două aspecte ale mecanismului de alterare. Primul aspect îl constituie faptul că alterarea cărnii la temperaturi joase are loc fără descompunerea completă a proteinelor primare. Pe măsură ce cărnurile suferă o alterare microbiologică, ERV este mai degrabă diminuat, decât crescut, cum se întâmplă în cazul când are loc degradarea completă a proteinelor. Al doilea aspect evidențiat de ERV îl constituie creşterea capacității de hidratare a proteinelor din carne, printr-un mecanism necunoscut, deşi s-a dovedit că aminoacizii produşi de către biota de alterare joacă un rol important în acest sens. Se pune întrebarea, cum îşi satisfac bacteriile de alterare nevoile nutriționale în absența unei descompuneri complete a proteinelor.

Cărnurile proaspete păstrate la frigider sunt atacate de către microorganismele psihrofile. În cazul cărnurilor cu un pH de aproximativ 5,6 sunt prezenţi suficienţi hidraţi de carbon simpli, pentru ca să susţină aproximativ 10^8 microorganisme/cm^2. Biota heterogenă din carnea proaspătă, care se dezvoltă rapid şi utilizează glucoza la temperatura de refrigerare este reprezentată de pseudomonade. O oxigenare bună a suprafeţei va avea un efect benefic asupra creşterii finale a acestor bacterii.

Brochothrix thermosphacta este şi el capabil să utilizeze glucoza şi glutamatul, dar din cauza ratei de creştere mai lente, acesta pierde competiţia cu pseudomonadele. Când populaţia de pe suprafaţă ajunge la aproximativ 10^8/cm^2, aportul de carbohidraţi simpli este epuizat, iar în acest moment se pot evidenţia mirosurile neplăcute, în funcţie de măsura în care a avut loc utilizarea aminoacizilor liberi. Odată ce carbohidraţii simpli au fost epuizaţi pseudomonadele împreună cu alte psihotrofe Gram negative (*Moraxella, Alcaligenes, Aeromonas, Serratia, Pantoea*) utilizează aminoacizii liberi şi compuşii azotaţi ca sursă de energie. Speciile de *Acinetobacter* utilizează mai întâi aminoacizii, iar apoi lactatul, iar creşterea lor este redusă la un pH de sub 5,7. În ceea ce priveşte carnea de pasăre, conversia glucozei în gluconat pare să confere pseudomonadelor avantajul competitiv.

Un grup de cercetători au sugerat că predominarea speciei *P. fragi* în sucul de miel la un pH 6,0 şi la o temperatură de 4°C, s-a datorat capacităţii acesteia de a utiliza creatina şi creatinina. S-a observat că *P. fluorescens* este mai abundent în cărnurile proaspete decât *P. fragi*, dar că acesta din urmă devine cu timpul predominant.

Mirosurile fetide, asociate, în general cu cărnurile în curs de alterare îşi datorează originea aminoacizilor liberi şi compuşilor înrudiţi (H_2S din aminoacizii cu sulf; NH_3 din mulţi aminoacizi; indol din triptofan). Mirosurile neplăcute apar atunci când aminoacizii încep să fie utilizaţi. În cazul cărnurilor de culoare închisă, tari şi uscate (DFD), cu un pH final peste 6,0 şi un raport mai redus de carbohidraţi simpli, alterarea are loc mai rapid, iar mirosurile neplăcute pot fi detectate în cadrul unui număr de celule de aproximativ 10^6/cm^2. În cazul cărnurilor normale sau DFD (dark, firm and dry) proteinele nu sunt atacate, până când aportul de constituenţi mai simpli nu este epuizat. S-a demonstrat, de exemplu, că antigenicitatea proteinelor solubile în sare, din carnea de vită, nu este distrusă în condiţiile obişnuite de alterare la temperatură joasă.

În cazul alterării peştelui, s-a demonstrat că sucul din peştele crud presat, prezintă toate aspectele evidente ale alterării, după cum se poate determina şi prin utilizarea peştelui integral. Acest lucru indică absenţa generală a unui atac microbiologic asupra proteinelor solubile, deoarece acestea au fost absente în sucul filtrat. Acelaşi aspect este valabil şi pentru

alte tipuri de cărnuri. Alterarea incipientă este însoțită de o creştere a pH-ului, a numărului de bacterii şi a capacității de hidratare a proteinelor din carne, împreună cu alte modificări. În carnea de vită tocată, pH-ul poate creşte la un grad înalt de 8,6 (în cărnurile în putrefacție), deşi în momentul alterării incipiente s-au înregistrat şi valori medii de pH de aproximativ 6,5.

Prin reprezentarea curbei de creştere a biotei de alterare pot fi observate fazele obişnuite de creştere, faza de declin, putând fi atribuită epuizării nutrienților şi acumulării produselor secundare, toxice, de metabolism. Mecanismul exact prin care sunt distruse proteinele primare din carne nu este, încă, complet elucidat.

Dainty şi colaboratorii au inoculat „slime” (mucilagiu) de vită în bucăți de carne proaspătă şi le-au incubat la 5°C. Mirosul neplăcut şi mucilagiul au apărut după 7 zile cu un număr de microorganisme de $2x10^9/cm^2$. Proteoliza nu a fost detectată în fracțiunile miofibrilare sau sarcoplasmice, nici după 2 zile, când numărul bacteriilor a atins $10^{10}/cm^2$. În cazul cărnii de vită contaminată natural, mirosurile şi mucilagiul au fost observate după 12 zile, când numărul bacteriilor a ajuns la $4x10^8/cm^2$. Modificările proteinelor miofibrilare au apărut după a 18-a zi de păstrare. Cu ajutorul unor studii pe culturi pure, Dainty a demonstrat că pseudomonadele sunt active împotriva proteinelor miofibrilare, în timp ce alte bacterii acționează asupra proteinelor sarcoplasmice. Speciile de Aeromonas s-au dovedit a fi active atât asupra proteinelor miofibrilare, cât şi asupra celor sarcoplasmice. În cazul culturilor pure, modificările proteinelor nu au fost detectate, decât când numărul bacteriilor a ajuns la peste $3,2x10^9/cm^2$.

4.9. Alterarea ficaților proaspeți

Procesele de alterare ale ficaților (vită, porc, miel) nu sunt atât de bine definite ca în cazul cărnurilor. Pe baza conținutului relativ ridicat în carbohidrați şi a unui pH mediu de 6,41 este de aşteptat să se producă o alterare fermentativă, cu un pH sub 6,0. Majoritatea studiilor au fost efectuate pe ficați integrali, la care creşterea a fost evaluată la suprafață, din sucul acestora sau din țesutul profund.

Într-un studiu efectuat pe ficați de vită, tăiați în cuburi, pH-ul inițial 6,3 a scăzut la aproximativ 5,9, după 7-10 zile de incubare la 5°C, iar biota predominantă de alterare a fost formată din bacterii acidolactice.

În majoritatea altor studii s-a constatat că biota predominantă de alterare a constat, în esență, în aceleaşi tipuri de microorganisme, care contribuie la alterarea muşchilor. În ficații de porc, ținuți la 5°C, 7 zile, bacteriile predominante au fost *Pseudomonas, Alcaligenes, Escherichia*,

streptococii lactici şi *B. thermosphacta.* În 5 ficaţi de vită ţinuţi la 2°C, 14 zile, Pseudomonas a constituit 7% biota de alterare de 100%, în timp ce pH-ul iniţial a fost 6,49 şi a scăzut la 5,93.

Într-un alt studiu, pe ficaţi de vită, porc şi miel, biota predominantă după 5 zile la 2°C, a diferit în cele 3 produse, astfel: în ficaţii de vită au predominat streptococii, levurile, bacteriile corineforme şi pseudomonadele; în ficatul de miel: bacteriile corineforme, micrococii şi streptococii şi în ficatul de porc: stafilococii, *Moraxella-Acinetobacter* şi streptococii. Într-un studiu efectuat de Gill şi De Lacy, privind alterarea ficaţilor de miel în biota de suprafaţă alterată au predominat: *Pseudomonas, Acinetobacter* şi *Enterobacter*; în picătura din ficaţii întregi au fost dominante *Pseudomonas* şi *Enterobacter*, în timp ce *Enterobacter* şi lactobacilii au dominat în ţesuturile profunde. În acest studiu s-a arătat că pH-ul a fost în jur de 6,4 şi a scăzut în jur de 5,7 în probele tratate cu antibiotice, ceea ce arată că procesele glicolitice din ficat pot duce la o scădere a pH-ului, deşi aceste probe au conţinut mai puţin de 10^4 microorganisme/cm^2. Nivelul ridicat al glucozei a fost suficient pentru a permite o creştere vizibilă a coloniilor de suprafaţă, înainte de dezvoltarea mirosurilor neplăcute. Aceasta ar putea constitui explicaţia predominării biotei de alterare a ficaţilor de către tipurile non lactice.

Tabelul 4.1.

pH-ul şi concentraţia de glicogen, glucoză, acid lactic şi amoniac din 10 ficaţi proaspeţi

Produşi	Valoarea medie şi limite
Glucoză	2,73 (0,68-6,33) mg/g
Glicogen	2,98 (0,70-5,43) mg/g
Acid lactic	4,14 (3,42-5,87) mg/g
Amoniac	7,52 (6,44-8,30) μmol/g
pH	6,41 (6,26-6,63)

Sursa: Gill şi DeLacy.

Capitolul 5
Indicatori de calitate şi siguranță microbiologică alimentară

Indicatorii de calitate ai unui produs microbiologic sunt reprezentați de microorganisme şi/sau produsele lor metabolice a căror prezență în alimente şi la anumite niveluri pot fi folosiți pentru reflectarea calității microbiologice a acestora, cât şi pentru prognosticarea valabilității produsului respectiv.

Când sunt utilizate în acest mod, microorganismele indicatoare trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

1. Să fie prezente şi decelabile în alimentele care trebuie evaluate;
2. Creşterea şi numărul lor să fie într-o corelație negativă directă cu calitatea produsului;
3. Să poată fi uşor detectate şi numărate şi să fie net diferențiabile de alte microorganisme;
4. Să fie numărate într-o perioadă scurtă de timp (în decursul unei zile de muncă);
5. Creşterea lor să nu fie afectată negativ de alte componente ale microbiotei din alimente.

În general, indicatorii de calitate cei mai exacți tind să fie specifici unui anumit produs:

Tabelul 5.1

Microorganisme implicate în alterarea produselor alimentare

Microorganisme	Produse alimentare
Acetobacter spp.	Cidru proaspăt
Bacillus spp.	Pâine dospită
Byssochlamys spp.	Fructe zaharisite
Clostridium spp.	Hard cheese (sortiment de brânză canadiană)
Geotrichum spp.	Fructe conservate
Bacterii acide lactice	Bere
Lactococcus lactic	Lapte crud
Leuconostoc mesenteroides	Zahăr

Microorganisme	Produse alimentare
Pectinatus cerevisiiphilus	Bere
Pseudomonas putrefaciens	Unt
Levuri	Sucuri concentrate de fructe
Zygosaccharomyces bailii	Maioneză, dressing-uri de salate

Produsele menționate în tabel au o biotă restrânsă, iar alterarea este produsă de un microorganism unic. Când deteriorarea alimentului este produsă de un singur microorganism, numărul de germeni poate fi monitorizat prin cultivare selectivă sau printr-o metodă ca *impedanța* (care se bazează pe utilizarea unui mediu selectiv adecvat).

Indicatorii de calitate microbiologică sunt de fapt microorganisme de spoliere (alterare), care prin creşterea numărului lor determină pierderea calității produsului. Produsele metabolice pot fi folosite, de asemenea, pentru evaluarea şi prognosticarea calității microbiologice a unor alimente.

Tabelul 5.2.

Produşi metabolici microbieni implicați în alterarea produselor alimentare conservate

Metaboliți	Produse alimentare conservate
Cadaverină şi putresceină	Carne de vacă în vacuum
Diacetil	Concentrat de suc înghețat
Etanol	Suc de mere, produse din peşte
Histamină	Conserve de ton
Acid lactic	Conserve de legume
Trimetilamină (TMA)	Peşte
Baze volatile totale (TVB), nitrogen volatil total (TVN)	Fructe de mare
Acizi graşi volatili	Unt, smântână

S-a constatat că diaminele (cadaverina şi putresceina), histamina şi poliaminele sunt valoroase ca indicatori pentru mai multe produse. Diacetilul s-a dovedit a fi cel mai bun indicator negativ de calitate, în concentratul de suc de portocale congelat, în care generează o aromă de lapte bătut la niveluri de 0,08 ppm sau mai mari. Murdock a elaborat o metodă de detectare de 30 de minute. Etanolul a fost folosit ca indicator de calitate pentru somonul conservat, în care 25-74 ppm erau asociate cu „offness”, iar la niveluri de peste 75 ppm s-a produs alterarea.

S-a constat că etanolul reprezintă cel mai bun indicator de prognostic a mai multor alcooli, în extracte de peşte conservate la 5°C, în care 227 din 241 de izolate de peşte alterat au produs acest alcool.

Acidul lactic a fost acidul organic cel mai frecvent din legumele conservate, iar pentru determinarea sa a fost elaborată o metodă rapidă (2 ore) pe placă de gel de siliciu.

Producerea de trimetilamină (TMA) din oxid de N-TMA, din alterarea peştelui a fost utilizată de un număr mare de cercetători ca indicator de calitate sau alterare.

Pentru măsurarea substanțelor volatile totale folosite ca indicatori de calitate la peşte s-au folosit mai multe proceduri, incluzând bazele volatile totale şi alți compuşi ai azotului eliberați prin distilarea cu vapori de aburi a produselor de peşte.

Metodele de numărare a microorganismelor viabile totale au fost utilizate pentru evaluarea calității produselor. Ele sunt, mai degrabă, indicatori ai stării existente a produselor respective, decât indicatori de valabilitate.

În ansamblu, indicatorii de calitate microbieni pot fi folosiți pentru produsele alimentare care au o biotă limitată. În cazurile în care calitatea alimentului este afectată nesemnificativ de acumularea anumitor produşi metabolici, ele pot fi folosite ca indicatori de calitate.

Stabilirea numărului total de germeni viabili este o metodă mult mai sigură decât numărătorile microscopice directe, dar nu reprezintă cea mai eficientă metodă de determinare.

5.1. Indicatorii de siguranță alimentară

Indicatorii microbieni se folosesc, mai frecvent, pentru evaluarea siguranței şi igienei alimentare, decât a calității. Ideal ar fi ca un indicator de siguranță alimentară să fie:

a) decelabil uşor şi rapid;

b) să fie uşor de diferențiat de alți membrii ai biotei alimentare;

c) să prezinte un istoric de asociere constantă cu agentul patogen, a cărui prezență trebuie indicată;

d) să fie prezent întotdeauna când este prezent şi agentul patogen;

e) să fie un organism al cărui număr să se coreleze (în mod ideal) cu numărul agenților patogeni respectivi;

f) să aibă condiții şi o rată de creştere egală sau mai mare decât agentul patogen;

g) să aibă o rată de dispariție, cel puțin paralelă cu cea a agentului patogen şi care în mod ideal să persiste puțin mai mult decât agentul patogen respectiv.

Aceste criterii se aplică la majoritatea produselor care pot fi vehicule de transport ai agenților patogeni din alimente.

De-a lungul timpului s-a considerat că agenții patogeni care produc intoxicații alimentare, fiind de origine intestinală, rezultă direct sau indirect din contaminarea alimentelor cu fecale. Ca atare, astfel de indicatori sanitari au fost utilizați în decursul timpului pentru determinarea contaminării cu fecale a apelor.

Primul indicator pentru contaminarea fecală a fost *Escherichia coli*. Când acest indice coli a fost aplicat la siguranța alimentară au fost evidențiate mai multe criterii suplimentare, dintre care cele sugerate de Bauttiaux şi Mossel (1961), care mai sunt încă valabile:

(1) în mod ideal, bacteriile selecționate trebuie să-şi demonstreze specificitatea pentru mediile intestinale;

(2) (ele) trebuie să fie în număr foarte mare în fecale, astfel încât să fie găsite, chiar şi în diluții mari;

(3) să opună rezistență mare mediului extraintestinal, a cărui poluare trebuie evaluată;

(4) să permită detectarea relativ uşoară şi perfect exactă, chiar şi când microorganismele respective sunt prezente în număr foarte mic.

5.1.1. Coliformii

Pentru prima dată, Escherich, a reuşit să izoleze agentul etiologic al holerei în 1885. Inițial l-a denumit *Bacterium coli commune*, deoarece era prezent în scaunele bolnavilor examinați. Schardinger a fost primul care a propus folosirea acestui microorganism ca indicator de poluare cu fecale, deoarece acest agent a putut fi izolat şi identificat mai uşor decât ceilalți agenți patogeni, transmişi hidric.

În 1865, T. Smith, a propus un test de potabilitate a apei, marcând astfel începutul folosirii bacteriilor coliforme ca indicatori ai agenților patogeni din apă, practică extinsă apoi şi la alimente.

Taxonomie.

Bacteriile coliforme sunt bacili nesporogeni, Gram negativi, care fermentează lactoza în 48 ore şi produc colonii întunecate cu luciu metalic pe agar ENDO.

Bacteriile coliforme sunt reprezentate de 4-5 genuri ale familiei *Enterobacteriaceae: Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella.* Deoarece, genul *Roultella* a făcut parte în trecut din *Klebsiella*, ar putea fi considerat al cincilea gen de bacterii coliforme.

Tulpinile ocazionale de *Arizona hinshowii* şi *Hafnia alvei* fermentează lactoza, dar într-un timp mai mare de 48 de ore. Deoarece, *E. coli* reprezintă un indicator mai bun al poluării cu fecale, decât celelalte

genuri şi specii menţionate (în special, *E. aerogenes*) este de dorit ca incidenţa sa să fie determinată într-o populaţie coliformă.

Formula IMViC este metoda clasică, în care I reprezintă producţia de indol, M = roşu metil, V = Voges-Proskauer (producţia de acetoină), C = utilizarea citratului.

După această metodă, cele două microorganisme au următoarea formulă:

Tabelul 5.3.

	I	M	V	C
E. coli	+	+	-	-
E. aerogenes	-	-	+	+

Reacţia IMViC desemnează tipul I de *E. coli*, tulpinile de *E. coli* tipul II sunt -+--. Reacţia MR este cea mai concludentă pentru *E. coli. Citrobacter spp.* a fost menţionată ca bacterie coliformă intermediară, fiind cunoscut faptul că unele tulpini produc fermentaţia întârziată a lactozei. Toate sunt MR + şi VP -. Majoritatea sunt citrat pozitive, în timp ce producţia de indol este variabilă. Izolatele de Klebsiella sunt extrem de variabile, în ceea ce priveşte reacţia IMViC, deşi *K. pneumoniae* este în general MR-, VP+ şi C+, dar se cunosc variaţii, care se produc în reacţiile MR şi I.

Bacteriile coliforme se caracterizează prin producţia de acid şi gaz în bulion EC între 44°C şi 46°C, de obicei la 44,5°C sau 45,5°C (bulionul EC, pentru *E. coli*, a fost produs în 1942 de către Perry şi Hajna). Un test pentru coliformii fecali este în esenţă un test pentru *E. coli* tipul I, deşi unele tulpini de *Citrobacter* şi *Klebsiella* corespund definiţiei. Excepţii care merită să fie menţionate sunt tulpinile EHEC, care nu cresc la 44,5°C în formula standard a mediilor EC, dar care vor creşte când conţinutul în săruri biliare al mediului va fi redus de la 0,15% la 0,112%.

Tabelul 5.4

Reacţiile metabolice prezentate de speciile de *Escherichia spp.* cu implicaţii alimentare

Specia	Lactoză	Sorbitol	Indol	Roşu metil	Voges Proskauer	Decarboxilază
E. albertii	-	-	-	+	-	+
E. blattae	-	-	-	+	-	+
E. fergusonii	-	-	+	+	-	+
E. vulneris	-/+[a]	-	-	+	-	+

Specia	Lactoză	Sorbitol	Indol	Roşu metil	Voges Proskauer	Decarboxilază
E. hermannii	-/+	-	+	+	-	-
E. coli	+	+	+	+	-	+

Sunt prezentate 5 specii din genul *Escherichia*. *E. hermannii* şi *E. sakazakii* produc în general un pigment galben. Deoarece, 5 dintre ele nu produc gaz din lactoză, nu sunt incluse printre bacteriile coliforme. Totuşi, *E. albertii, E. vulneris* şi *E. hermanni* au fost inițial izolate din specimene umane. *E. albertii* a fost izolată dintr-un episod diareic de la copiii din Bangladesh. *E. vulneris* a fost izolată din plăgi, spută şi pulmon de la om, iar *E. hermannii* a fost recuperată din specimenele clinice umane. Din genul *Klebsiella*, au fost transferate mai multe specii în noul gen *Raoultella*. Deoarece, noul gen produce gaz din lactoză, face parte din bacteriile coliforme. Caracteristica acestui gen nou este capacitatea de a creşte la 10°C, spre deosebire de genul *Klebsiella* redefinit.

Edwardsiella tarda este asociată cu tractul gastrointestinal uman şi e un agent patogen oportunist al omului. Se găseşte, mai frecvent, în intestinul animalelor cu sânge rece şi este patogenă pentru țipari şi alți peşti, găsindu-se rareori în fecalele oamenilor sănătoşi.

Condiții de cultivare şi caractere culturale.

Asemenea majorității bacteriilor Gram negative, coliformii se dezvoltă bine pe mediile de cultură obişnuite şi în majoritatea alimentelor. Creşterea lor a fost raportată la temperaturi sub -2°C şi peste 50°C. În alimente creşterea este redusă sau foarte lentă la 5°C, însă uneori, cercetătorii au raportat o creştere a bacteriilor coliforme între 3 şi 6°C. Coliformii se dezvoltă, în general, în limitele unui pH cuprins între 4,4 şi 9,0. *E. coli* se poate dezvolta într-un mediu minim ce conține numai o sursă de cărbune organic, ca glucoza şi o sursă de azot, ca $(NH_4)_2SO_4$ şi alte minerale.

Pe agarul nutritiv, coliformii produc colonii vizibile în 12-16 ore la 37°C. Bacilii coliformi se dezvoltă în prezența sărurilor biliare, care inhibă bacteriile Gram pozitive.

Avantajul acestui fapt este folosit în izolarea selectivă din diferitele surse. Spre deosebire de alte bacterii, bacilii coliformi au capacitatea de a fermenta lactoza cu producere de gaz, iar această caracteristică este suficientă pentru determinările prezumptive. Datorită uşurinței generale cu care bacteriile coliforme pot fi cultivate şi diferențiate, ele reprezintă indicatori aproape ideali, exceptând faptul că identificarea lor poate fi complicată de prezența unor tulpini atipice.

Una dintre proprietățile importante a lui *E. coli* ca indicator fecal pentru apă este perioada sa de supraviețuire. În general aceasta este identică cu cea a majorității bacteriilor patogene intestinale, deşi unele rapoarte arată că unii agenți patogeni bacterieni sunt mai rezistenți în apă. *E. coli* nu este, însă, la fel de rezistentă la virusurile intestinale. Buttiaux şi Mossel au ajuns la concluzia că diferiți agenți patogeni pot rezista după ce *E. coli* este distrus în alimentele refrigerate, congelate sau iradiate. De asemenea, patogenii pot persista în ape tratate, după distrugerea lui *E. coli*. Numai în alimentele acide, *E. coli* are o valoare deosebită ca microorganism indicator, datorită rezistenței sale relative la un nivel redus de pH.

Ecologie.

Habitatul principal al lui E. coli este reprezentat de tractul intestinal al majorității homeotermelor, deşi uneori este absent în intestinul porcilor. Habitatul principal al lui *E. aerogenes* este vegetația şi uneori tractul intestinal.

Nu este greu să se demonstreze prezența bacililor coliformi în aer, praf, pe mâini, precum şi pe suprafața multor alimente. Problema nu constă în prezența bacteriilor coliforme, ci în numărul lor relativ. Majoritatea legumelor sau zarzavaturilor din piață conțin un număr mic de bacili coliformi, Gram negativi, care fermentează lactoza, dar dacă aceste produse sunt recoltate şi manipulate corect, numărul tinde să fie prea mic şi fără semnificație reală din punct de vedere al sănătății publice.

Criterii şi standarde pentru coliformi.

Deşi, prezența bacililor coliformi şi a bacteriei *E. coli* în alimente nu este deloc de dorit, ar fi practic imposibil să se elimine toate aceste microorganisme din alimentele proaspete şi congelate. Problemele fundamentale sunt legate de numărul lor şi anume:

1. În condiții adecvate de recoltare, manipulare, depozitare şi transport al alimentelor prin folosirea unui sistem de analiză la întâmplare într-un punct de control public, care este numărul cel mai scăzut posibil de bacili coliformi ce pot fi admişi în alimente?

2. La ce nivel calitativ indică *E. coli* sau alte bacterii coliforme că un produs este nociv?

În cazul unor produse lichide, lactate şi non-lactate, există un lung istoric de siguranță, legat de numărul admisibil de coliformi. Unele criterii şi standarde privind bacteriile coliforme şi *E. coli* pentru apă, produse lactate şi alte alimente sunt enumerate mai jos:

1. Maxim 10/ml pentru lapte pasteurizat gradul A şi produse lactate, inclusiv produse de cultură;

2. Maxim 10/ml pentru lapte brut certificat şi nu peste 1/ml pentru laptele pasteurizat certificat.

3. Maxim 100/ml pentru alimentele congelate înainte de fierbere şi parțial fierte.

4. Maxim 100/ml pentru produse umplute cu ouă şi lapte (budinci).

În alimentele uşor perisabile este admis un număr redus de bacili coliformi şi anume: între 1 şi 100 per gram (mililitru). Aceste criterii reflectă parametrii de flexibilitate şi siguranță alimentară.

Unele produse pentru care s-au recomandat limitele admise pentru coliformi, de către Comisia Internațională pentru Specificări Microbiologice pentru Alimente (ICMSF) sunt enumerate în tabelul de mai jos.

Tabelul 5.5.

Criterii recomandate pentru limitele admise în alimente pentru *E.coli*/coliformi

	Indicator/produs	**Class Plan**	**n**	**c**	**m**	**M**
Coliformi	Lapte praf	3	5	1	10	10^2
Coliformi	Praf de ouă	3	5	2	10	10^3
Coliformi	Alimente dietetice pentru sugari şi copii; diferite sortimente de biscuiți	3	5	2	10	10^2
Coliformi	Produse instant pentru torturi, prajituri, etc.	3	5	1	10	10^2
Coliformi	Produse uscate ce necesită fierbere pentru consum	3	5	3	10	10^2
Coliformi	Produse din crab gătite (ready-to-eat)	3	5	2	500	5.000
Coliformi	Creveți „ready-to-eat”	3	5	2	100	10^3
E. coli	Peşte proaspăt înghețat şi afumat; Crustacee înghețate	3	5	3	11	500
E. coli	Peşte gătit în prealabil; crustacee gătite şi înghețate	3	5	2	11	500
E. coli	Carne de crab gătită şi înghețată	3	5	1	11	500
E. coli	Legume/fructe înghețate, pH>4.5; legume uscate	3	5	2	10^2	10^3
E. coli	Moluşte proaspete/ înghețate	2	5	0	16	-

	Indicator/produs	Class Plan	n	c	m	M
E. coli	Apă îmbuteliată	2	5	0	0	-

n = nr. de probe examinate dintr-un lot pentru satisfacerea cerințelor unui „sampling plan" (un grup de criterii pentru acceptarea unui lot, bazat pe examinarea unui număr stabilit de probe prin metode analitice)
c = nr. maxim admis de probe dubioase (2-class plan) sau la limita de aceptabilitate (3-class plan). Când numărul este mai mare decât această limită lotul este respins.
m = o limită microbiologică, care pentru 2-class plan, separă alimentele de calitate bună de cele de calitate dubioasă sau pentru 3-class plan, separă alimentele de calitate bună de cele acceptate la limită.
M = o limită microbiologică, pentru 3-class plan, care separă probele acceptate la limită de cele de calitate dubioasă. Valorile mai mari sunt neacceptate.

Limite admise pentru folosirea indicatorilor de siguranță alimentară.

Ca mijloc de evaluare a faptului dacă pasteurizarea a fost efectuată corect, un comitet al Asociației Americane de Sănătate Publică a recomandat în 1920 folosirea indicatorilor coliformi, iar această metodă a fost introdusă în industria laptelui în jurul anului 1930.

Testele coliforme pentru produsele lactate nu sunt menite să indice contaminarea cu fecale, ci ele reflectă siguranța generală a produselor din fermele de lapte şi de sanitație a plantelor. Pentru legumele opărite şi congelate, numărul de bacterii coliforme nu prezintă semnificație sanitară, deoarece tipurile de Enterobacter sunt asociate, de obicei, cu vegetația. Totuşi, prezența bacteriei *E. coli* indică unele probleme de procesare. În cazul păsărilor de curte, bacteriile coliforme reprezintă un indicator bun de sanitație, deoarece salmonelele pot exista într-o crescătorie înainte de tăiere, iar rezultatele pozitive pentru fecale pot să nu fie legate de contaminarea de după tăiere.

Testul standard pentru coliformi nu este adecvat pentru carne, din cauza largii răspândiri a speciilor psihotrofe enterice şi a speciilor de *Aeromonas*, dar testele pentru coliformii fecali sunt utile.

Testele cu bacterii coliforme sunt folosite pe scară largă în sanitația crustaceelor, dar nu şi a calității acestora.

În general, în cazul crustaceelor din mediul marin („ape deschise") indicele coli reprezintă un bun indicator de calitate sanitară. Totuşi, unii agenți patogeni umani mai pot exista încă, în aceste crustacee. În cazul stridiilor nu există o corelație între bacteriile coliforme din fecale şi *V. cholerae* sau între *E. coli* pe de o parte şi *V. parahaemolyticus* sau *Yersinia enterocolitica* pe de altă parte.

Coliformii nu au valoare în evaluare în intoxicații cu scombroid (produs rezultat în urma consumului de peşte alterat) şi nici nu permit detectarea prezenței virusurilor intestinale.

Pentru igienizarea suprafețelor din fabricile de împachetare a cărnurilor *K. pneumoniae* (şi posibil, *Raoultella spp.*) ar putea constitui o alegere mai bună, decât *E. coli* generic.

În ciuda limitărilor menționate, valoarea bacililor coliformi, ca indicatori de siguranță este conformă, cel puțin pentru unele alimente. Ei sunt cel mai bine folosiți ca o componentă a unui program de evaluare a siguranței, cum ar fi sistemul HACCP.

5.1.2. Enterococii

Până în prezent sunt recunoscute aproximativ 30 de specii ale genului *Enterococcus*:

Înainte de 1984, „streptococii fecali”, erau reprezentați de două specii şi trei subspecii, fiind clasificați, împreună cu *S. bovis* şi *S. equinus*. Conțin antigenele Lancefield de grup D.

Istoric.

Escherich a fost primul care l-a descris pe *E. faecalis*, şi l-a denumit *Micrococcus ovalis,* în 1886. *E. faecium* a fost recunoscut, pentru prima dată în 1899 şi caracterizat în amănunțime de către Orlo-Jensen în 1919.

Datorită existenței lor în fecale, aceşti enterococi clasici au fost folosiți ca indicatori ai calității apei, încă din jurul anului 1900.

Ostrolenk şi Burton au fost primii care au comparat enterococii clasici cu bacteriile coliforme, ca indicatori ai siguranței. Caracteristicile semnificative ale enterococilor clasici, care au dus la utilizarea lor ca indicatori de poluare a apei, sunt:

(1) nu se multiplică în apă, în special dacă conținutul în substanțe organice este redus;

(2) în general sunt mai puțin numeroşi în fecalele umane, decât *E. coli.*

Tabelul 5.6

***Clasificare şi condiții de cultivare.* Proprietățile biochimice ale celor mai importante specii de enterococi**

Proprietăți metabolice	*E. faecalis*	*E.faecium*	*E.avium*	*E.casseliflavus*	*E. durans*	*E. malodoratus*	*E. gallinarum*	*E. hirae*	*E. mundtii*	*E. raffinosus*	*E. solitarius*	*E. pseudoavium*	*E. cecorum*	*E. sacharolyticus*	*E. columbae*	*E. dispar*	*E. flavescens*	*E. soriolicida*	*E. sulfureus*	*E. fallox*	*E. asini*
Creşte la:																					
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-

Proprietăți metabolice	*E. faecalis*	*E.faecium*	*E.avium*	*E.casseliflavus*	*E. durans*	*E. malodoratus*	*E. gallinarum*	*E. hirae*	*E. mundtii*	*E. raffinosus*	*E. solitarius*	*E. pseudoavium*	*E. cecorum*	*E. sacharolyticus*	*E. columbae*	*E. dispar*	*E. flavescens*	*E. soriolicida*	*E. sulfureus*	*E. fallox*	*E. asini*
45°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+/-
pH 9,6	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Bilă 40%	+	+	+	+	+	+	+	+	+						+			+	+		+
Albastru de metilen 0,1%		+	-	+	+								-						+		
Telurit de K 0,04%	+	-	-	+	-	-	-	-					-						+		
Tetrazolium 0,01%	+	-		+	-		+														
Rezistent la 60°C/30 min.	+	+	+	+	+/-	-	-							-	-	-					
Grup serologic D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			-	-	-	-	+	-		-
Motilitate	-/+	-	-	-/+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+		-			-
Pigmentare	-	-	-	G	-	-	-		G		-		-	-	-	-	G	-	G		-
Hidroliza esculinei	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
Hidroliza hipuratului	+/-	+	v	+/-	v	v	+	-	-	-		+	+	-	-	v	-	-	-		+
Hidroliza Argininei	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+						-	+	+	+	-	-
Producerea de H_2S	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-			
Acid din:																					
Glicerol	+	+	+	-	-	v	-/+	v	v	+	-		-	-	-	+	-	-	-		-
Manitol	+	+	+	+	-/+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-		-
Sucroză	+	v	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+		-

Proprietăți metabolice	*E. faecalis*	*E.faecium*	*E.avium*	*E.casseliflavus*	*E. durans*	*E. malodoratus*	*E. gallinarum*	*E. hirae*	*E. mundtii*	*E. raffinosus*	*E. solitarius*	*E. pseudoavium*	*E. cecorum*	*E. sacharolyticus*	*E. columbae*	*E. dispar*	*E. flavescens*	*E. soriolicida*	*E. sulfureus*	*E. fallox*	*E. asini*
Salicină	+	+	+/-					+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+
Lactoză	+	+	+	+	+		+	+	+	+	-	+	+	+	v	+	+	-	+		+
Arabinoză	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-			-
Rafinoză	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	-	+		-

Legendă: + = potitiv; - = negative; +/-, -/+, v = reacții variabile

E. faecalis se găseşte cel mai frecvent în fecalele mamiferelor, iar E. faecium la porcii domestici şi la mistreți.

Înainte de 1984, enterococii şi „streptococii fecali” erau în esență sinonimi, fiind reprezentați de următoarele specii *E. faecalis, E. faecium* şi *E. durans*.

La fel ca şi alte bacterii Gram pozitive, enterococii sunt mult mai pretențioşi din punct de vedere al cerințelor nutritive, decât bacteriile Gram negative, dar diferă de majoritatea celorlalte bacterii Gram pozitive, prin nevoia de mai mulți factori de creştere, în special vitaminele B şi aminoacizi.

Cerința de aminoacizi specifici permite folosirea unor tulpini în testele microbiologice pentru aceşti compuşi. Se dezvoltă în limite mai largi ale pH-ului decât toate celelalte bacterii, care se transmit prin alimente. Deşi, sunt aerobe, nu produc catalază (cu excepția unei pseudocatalaze, când se dezvoltă în prezența O_2) şi sunt microaerofile, deoarece se dezvoltă bine în condițiile unui potențial de oxidoreducere scăzut (Eh).

Habitat.

E. faecalis şi *E. faecium* sunt cunoscute ca specii fecale, iar speciile noi necesită, în continuare studiul aspectelor lor naturale, în special în ceea ce priveşte apariția lor în fecale. *E. hirae* şi *E. durans* au fost izolate frecvent de la păsări şi bovine, *E. gallinarum* de la păsările de curte. *E. durans* şi *E. faecium* sunt asociate cu tractul intestinal al suinelor, iar *E. faecalis* pare să fie mai specific pentru tractul intestinal uman. *E. cecarum* a fost izolat din cecum de la pui, *E. columbae* din intestinul de porumbel, iar *E. saccharolyticum* de la vaci. *E. avium* se găseşte în fecalele de mamifere şi pui; *E. casseliflavus* în grâne însilozate, în soluri şi plante. *E.*

mundtii de la vaci, mâinile mulgătorilor, sol şi plante; *E. hirae* de la pui şi intestinele de porc; *E. dispar* de la om şi *E. gallinarum* din intestinele păsărilor.

Este bine stabilit până în prezent faptul că enterococii clasici se găsesc în plante, insecte şi sol. Speciile pigmentate în galben sunt asociate cu plantele, iar *E. cecarum* cu cecumul puilor de găină. Enterococii izolaţi de pe insecte şi plante pot proveni din fecalele animale. Astfel, enterococii pot fi consideraţi ca rezidenţi temporari fiind diseminaţi în vegetaţie de către insecte cand ajung la nivelul solului prin ploaie şi gravitaţie.

Deşi, *E. faecalis* este considerat ca fiind de origine fecală, unele tulpini se găsesc pe vegetaţie şi ca atare nu au o semnificaţie sanitară, atunci când se găsesc în alimente. Mundt a studiat *E. faecalis* de la oameni, plante şi alte surse şi a constatat că indicatorii nefecali pot fi diferenţiaţi de cei fecali prin reacţia lor în laptele turnesolat şi prin fermentarea melizitozei şi melibiozei. Într-un alt studiu pe 2.334 izolate de *E. faecalis* din alimente uscate şi congelate, o proporţie mare de tulpini a prezentat o asemănare strânsă cu tipurile rezidente pe vegetaţie şi de aceea nu au avut o semnificaţie sanitară. Când sunt folosiţi ca indicatori sanitari de calitate în alimente este necesar să se stabilească dacă izolatele sunt de tip vegetal sau sunt de origine umană. Enterococii se pot găsi şi în particulele de praf. Sunt larg distribuiţi, în special în abatoare şi afumătoare, în care sunt procesate produse de porc. În ceea ce priveşte utilitatea enterococilor clasici, ca indicatori ai poluării apei, unii cercetători care au studiat persistenţa lor în apă au constatat că ei dispar într-un ritm mai rapid decât bacteriile coliforme, în timp ce alţi cercetători au făcut constatarea inversă.

Leininger şi McCleskey au observat că enterococii nu se multiplică în apă, în timp ce coliformii dimpotrivă.

Cerinţele lor mai dificile de creştere pot fi considerate ca indicând un rol mai puţin competitiv în mediile hidrice. În apele menajere, coliformii şi enterococii clasici au fost găsiţi în număr mare, dar s-au găsit aproximativ de 13 ori mai multe bacterii coliforme decât enterococii.

Într-un studiu efectuat când genul *Enterococcus* era format din numai 8 specii, Devriese şi alţii au studiat 264 de izolate de enterococi, obţinuţi din intestinele unor animale de fermă. Tulpinile au fost selectate pe baza creşterii lor în bilă 40% şi NaCl 6,5%. Din cele 264 de izolate, 225 au fost conforme uneia din cele 8 specii: *E. faecalis, E. faecium, E. hirae* reprezentând 37,6%, 29,8% şi 23% din izolate. Alte specii identificate au fost *E. durans* (5,1%), *E. gallinarum* (1,6%), *E. avium* (1,2%), *E. mundtii* (1,2%) şi *E. casseliflavus* (< 1%).

Aceste 255 de izolate au fost obţinute de la 8 specii de animale, numărul cel mai mare provenind de la păsările de casă, vite şi porci.

Într-un studiu ulterior al enterococilor din alimentele de origine animală, din Belgia, au fost izolate 161 de tulpini din următoarele alimente: cărnuri, brânzeturi, peşte, crustacee şi combinații brânză-carne.

E. faecium a reprezentat 58,4% (94 din 161) şi *E. faecalis* 26,1% (42 din 161) fiind reprezentate de *E. hirae/E. durans*.

Relația cu calitatea sanitară a alimentelor.

Un număr mare de cercetători au constatat că enterococii clasici sunt indicatori mai buni ai calității sanitare a alimentelor decât bacteriile coliforme, în special pentru alimentele congelate.

Într-un studiu pe 376 de probe de zarzavat congelate, în comerț, Burton a constatat că bacteriile coliforme reprezintă indicatori mai eficienți ai stării sanitare decât enterococii, înainte de congelare, în timp ce enterococii au fost indicatori superiori după congelare şi depozitare.

În probele depozitate la -20°C timp de 1-3 luni, au supraviețuit 81% din enterococi şi 75% din coliformi. După 1 an, au supraviețuit 89% din enterococi şi numai 60% din coliformi. Într-un alt studiu enterococii au rămas relativ constanți 400 de zile, când au fost depozitați la temperatura de congelare. Enterococii au fost recuperați din 57% din cele 14 probe de alimente uscate. În tabel este prezentată longevitatea relativă a bacteriilor coliforme şi a enterococilor în oasele de peşte.

Tabelul 5.7

Nr. zile depozitare la 6°F	Coliformi	Enterococi
0	5.600.000	15.000.000
7	6.000.000	20.000.000
14	1.400.000	13.000.000
20	760.000	11.300.000
35	440.000	11.200.000
49	600.000	20.000.000
63	88.000	11.000.000
77	395.000	15.000.000
91	125.000	41.000.000
119	50.000	5.400.000
133	136.000	7.400.000
179	130.000	5.600.000

Nr. zile depozitare la 6°F	Coliformi	Enterococi
207	55.000	3.500.000
242	14000	4.000.000
273	21000	4.000.000
289	42000	3.200.000
347	20000	2.300.000
410	8000	1.600.000
446	260	2.300.000
481	66	5.000.000

În ansamblu, ridicarea de la „treapta fecală” la statutul de gen şi expansiunea genului prin includerea unor specii ce apar să nu aibă nici o asociere naturală cu materiile fecale ridică probleme privind utilitatea acestui grup ca indicator sanitar. Între anii 1960-1970 s-au sugerat, pentru o serie de alimente, toleranțe enterococice, dar acestea nu au mai fost luate în considerație în ultimii ani. Folosirea enterococilor ca indicatori de siguranță alimentară a dispărut net probabil din cauza interesului concomitent privind unele căi mai rapide şi mai eficiente de detectare şi numărare a lui *E. coli*. Ca indicatori ai calității sanitare a alimentelor, enterococii şi coliformii sunt prezentați în tabelul de mai jos:

Tabelul 5.8.

Caracteristici	Coliformi	Enterococi
Morfologie	bacili	coci
Reacția Gram	negativă	pozitivă
Incidența in tractul intestinal	10^7-10^9/g fecale	10^5-10^8/g fecale
Incidența în materii fecale	în unele probe absent	prezent în majoritatea probelor
Specificitatea in tractul intestinal	în general specific	puțin specific
Incidența în afara tractului intestinal	de obicei în număr redus	de obicei în număr mare
Uşurința izolarii şi identificarii	relativ uşor	dificil
Răspunsul la condițiile de mediu	puțin rezistent	rezistent
Răspunsul la congelare	puțin rezistent	rezistent

Caracteristici	Coliformi	Enterococi
Supraviețuirea în alimente congelate	scăzută	ridicată
Supraviețuirea în alimente uscate	scăzută	ridicată
Incidența în legume proaspete	scăzută	ridicată
Incidența în cărnuri proaspete	scăzută	scăzută
Incidența în cărnuri afumate	scăzută sau absentă	ridicată
Asocierea cu alți patogeni alimentari intestinali	crescută	scăzută
Asocierea cu alți patogeni alimentari neintestinali	scăzută	scăzută

5.1.3. Bifidobacteriile

Tissier (1900), în cursul cercetărilor sale privind scaunele sugarilor, a identificat un microorganism ce apărea cu frecvență mare şi l-a denumit *Bacillus bifidus*; mai târziu a fost denumit *Lactobacillus bifidus*, iar în prezent este cunoscut sub numele de *Bifidobacterium bifidum*. Apariția frecventă a bifidobacteriilor în fecale, l-a determinat pe Mossel să sugereze folosirea acestei bacterii anaerobe, Gram pozitive ca indicator al poluării ,fecale, în special a apelor. Unele bifidobacterii sunt utilizate în producerea laptelui fermentat, a iaurtului şi a altor produse alimentare, fiind considerate benefice pentru sănătate.

Genul *Bifidobacterium* cuprinde aproximativ 25 de specii de bacterii catalază-negative, non-motile, cu temperaturi minime şi maxime situate între 25-28°C, respectiv 43-45°C.

Cresc bine la un pH între 5 şi 8 şi produc acid lactic şi acid acetic, ca produse finale ale metabolismului lor de carbohidrați.

Distribuție. *Bifidobacteriile* se găsesc în fecalele umane în cantități mai mari (10^8-10^9/per gram), decât *E. coli* (10^6-10^7/per gram), iar acest lucru îi face mult mai importanți ca indicatori ai poluării fecale umane.

Determinarea originii lor se face din următoarele 3 surse: fecale umane, fecale animale sau condițiile de mediu. Metoda de diferențiere între tulpinile umane şi cele animale a fost elaborată de către Gavini şi alții, care împart bifidobacteriile în 7 grupe, iar cele de origine umană aparțin grupelor I, III şi XII.

Într-un studiu pe 50 de probe de carne tocată, 39 au conținut, atât *E. coli*, cât şi bifidobacterii. Dintre acestea numai 2 au fost de origine umană, în timp ce celelalte au fost de origine animală.

B. adolescentis şi *B. longum* au fost cel mai frecvent izolate în număr mare – peste 10^6/100 ml din reziduuri umede. Ele au fost sugerate ca indicatori de contaminare fecală recentă în apele dulci tropicale, deoarece dispar mai rapid decât coliformii şi enterococi.

În ansamblu, strânsa asociere a bifidobacteriilor cu fecalele, faptul că nu apar în apă şi asocierea unor specii numai cu fecalele umane fac din aceste bacterii buni indicatori ai poluării. Pentru că sunt strict anaerobi, tind să crească mai încet şi sunt necesare mai multe zile pentru obţinerea rezultatelor. Cresc cu mai multă probabilitate în carne şi produse marine, decât în legume (din cauza Eh-ului natural mai mare, în acestea din urmă). Este posibil ca ele să servească ca indicatori pentru cărnuri şi alimentele marine.

5.1.4. Colifagii şi enterovirusurile

Cercetătorii din jurul anilor 1920 au evidenţiat că bacteriofagii apar în apă în asociaţie cu gazdele lor bacteriene. Acest lucru i-a determinat pe Pasicicha şi De Monte să sugereze că fagii specifici pentru unii agenţi patogeni intestinali pot fi consideraţi ca indicatori indirecţi ai speciilor lor gazdă bacteriene. O procedură de testare pentru colifagi, pentru probele de apă ce conţin 5 sau mai mulţi fagi/100 ml şi care poate fi efectuată în 4-6 ore a fost descrisă în Metodele Standard pentru Examinarea Apelor şi a Apelor Reziduale. Astfel a fost stabilită utilitatea testului pentru colifagii din apă, folosind tulpinile C de *E. coli*. Deoarece nu este posibilă numărarea tuturor fagilor de *E. coli* sau a oricărei alte bacterii specifice, se sugerează folosirea indicatorilor micşti pentru obţinerea unor rezultate foarte bune.

Deoarece, testul pentru colifagi, prin folosirea gazdelor de *E. coli* poate afecta fagii heterogeni cu diferite caracteristici de supravieţuire, detectarea unor fagi specifici de gen masculin („male-specific-phages") este o metodă care duce la o populaţie de fagi mai omogenă.

Fagii specifici genului masculin sunt monocatenari, omogeni, asemănători ca structură şi mărime enterovirusurilor. Deşi gazdele lor standard sunt tulpinile F^+ şi Hfr de E. coli K-12, celulele gazdă pot fi constituite din inserţii de plasmide în *Salmonella Typhimurium*. Aceste celule conţin pili F, care servesc ca receptori pentru citofagii specifici masculini, fiind utilizat în acelaşi mod ca şi gazdele de *E. coli*.

Utilitatea pentru apă. Determinarea coliformilor totali din apă, prin numărarea fagilor lor, a fost demonstrată ca fiind utilizabilă de către unii cercetători şi imposibil de a fi realizată de către alţii. Într-un studiu al colifagilor şi coliformilor totali şi fecali din apele naturale, din 10 oraşe, s-a constatat o relaţie lineară, între cele două grupe.

Deoarece, bacteriile şi virusurile posedă proprietăţi diferite în ceea ce priveşte persistenţa în mediul înconjurător, colifagii au atras interesul celor ce se ocupă de indicatorii de enterovirusuri, în special din apă.

S-a demonstrat că, supravieţuirea coliformilor din apă este paralelă cu aceea a enterovirusurilor umane. Într-un studiu al apelor aprobate pentru recoltarea de stridii, de-a lungul Coastei Golfului nici nivelul de *E. coli* şi nici nivelul bacteriilor coliforme nu au fost predictive pentru prezenţa enterovirusurilor în stridii. În apele de recreaţie, considerate sigure, prin standardele pentru coliformi, enterovirusurile au fost detectate în 43% din probe.

Într-un studiu al apelor deschise de-a lungul coastei Carolinei de Nord, virusurile enterice au fost izolate din 3 din 13 probe de 100 grame de moluşte, din albii deschise, iar, 6 din 15 probe au fost pozitive când s-au recoltat din albii închise. O epidemie bine documentată de hepatită A umană a fost atribuită consumului de stridii, recoltate din apele deschise.

Într-un studiu care a comparat numărul de colifagi totali, fecali, enterococi pe plăci standard de numărare a acestora din apă, după diferite procese de tratare, colifagii s-au corelat mai bine cu enterovirusurile, decât cu oricare din celelalte grupe menţionate. Când produşii reziduali secundari au fost testaţi pentru colifagii masculini au fost găsite 8.200 de unităţi formatoare de colonii (UFC). Deoarece, unii colifagi au fost raportaţi ca având habitatul natural în apele din mediul înconjurător este posibil ca numărul lor să nu se coreleze direct cu poluarea fecală.

Colifagii de gen masculin sunt indicatori mai buni ai poluării fecale a apelor, decât colifagii totali, deoarece ei nu formează pili F la temperaturi sub 30°C şi, deci, nu pot infecta celulele lor gazdă F*. Asemănător colifagilor, fagii lui *Bacteroides fragilis* au fost găsiţi în ape, cu niveluri mari de reziduuri fecale umane (dejecţii). Deşi, numărul lor este mai redus decât cel al colifagilor sunt mult mai specifici fecalelor umane. Într-un studiu au fost găsiţi în număr semnificativ, în apele reziduale din abatoare sau în apele ce conţin materii fecale de la animalele sălbatice. Aceşti cercetători au arătat că fagii *B. fragilis* se multiplică numai în condiţii anaerobe.

Fagii DNA dublu-catenari (DNA d.c.) de *Vibrio vulnificus*, împreună cu celulele gazdă au fost găsiţi în diverse ţesuturi şi fluide de stridii, fiind mai abundenţi şi mai variaţi în moluşte, ceea ce sugerează posibila lor utilizare ca indicatori ai prezenţei speciei *V. vulnificus*. Într-un alt studiu s-a constatat că numărul cel mai redus al acestor microorganisme a fost în lunile ianuarie-martie şi cel mai mare în timpul verii şi al toamnei, când numărul lor, per gram, a fost de 10^3-10^6, iar fagii de *V. vulnificus* au fost de asemenea prezenţi în număr maxim în acea perioadă.

Unele enterovirusuri umane supravieţuiesc mai bine în apă decât

coliformii, fiind mai rezistente la clor. Clorul a distrus 99,999% din coliformii fecali, coliformii totali şi streptococii fecali produşii reziduali primari, în timp ce virusurile au fost distruse în proporție de 85-99%.

Au fost comparați 4 fagi din punct de vedere al rezistenței la încălzire, uscare, expunere la ClO_2. Virusul hepatitei A a fost mai rezistent decât poliovirusul I şi decât colifagii RNA (MS2) şi DNA (ØX174),

Enterovirusurile bovine produc la această specie infecții asimptomatice şi au fost găsiți în fecalele a 76% din 139 de vite, 38% din 50 de cerbi cu coada albă şi la una din 3 gâşte de Canada. În acest studiu toate animalele menționate au folosit aceeaşi păşune şi acelaşi râu, iar enterovirusurile bovine au fost găsite în stridiile din apele de râu din avalul fermei.

Teschovirusurile, care sunt specifice speciei porcine (PTV), au fost depistate la 92 de porci dintr-o fermă, folosind tehnica (PTV-RNA). Acest grup de virusuri permite determinarea originii poluării (şi anume de ce specie anume este provocată).

Utilitatea pentru alimente. Utilitatea folosirii colifagilor pentru determinarea coliformilor din alimente a fost pentru prima dată raportată de către Kennedy et. al. în 1984. Aceştia au folosit o incubare de la 16 ore, până la 18 ore, la 35°C şi au izolat colifagi din toate cele 18 probe de pui proaspeți şi de cârnați de porc. Numărul cel mai mare de colifagi a fost găsit la puii proaspeți (3,3-4,4 log_{10} UFC/100 g). În general, coliformii se corelează mai bine cu *E. coli* şi bacilii coliformi fecali, decât cu coliformii totali. pH-ul cuprins între 6,0-9,0 nu a afectat colifagii din alimente. Rezultatele pot fi obținute în 4-6 ore, dar aceşti cercetători au preferat incubarea timp de 16-18 ore. Pe de altă parte, colifagii de gen masculin specifici, de *S. Typhimurium* nu au fost corelați cu coliformii fecali, totali sau cu determinarea numărului în plăci aerobe la 472 de probe de stridii din Chesapeake Bay.

A fost investigată posibila utilizare a colifagilor de gen masculin specifici (F+), ca indicatori pentru morcovii proaspeți şi din 25 de morcovi testați, 25% au fost pozitivi pentru fagii F+, 8% pentru *E. coli*, 4% pentru *Salmonella*.

Din carnea tocată de vită şi pui au fost izolați 3 grupe de fagi diferiți, 100% 5 colifagi F+, 69% colifagi somatici şi 65% 3 fagi de *Salmonella*.

Sensibilitatea testului fagic pentru carnea de vită sau pui a fost de 38 UFC/100 g.

În ansamblu, datele obținute sugerează că testele pentru colifagi pot fi adecvate, fie ca o alternativă pentru determinarea lui *E. coli* sau a coliformilor, fie ca indicatori direcți pentru enterovirusuri. Datorită faptului că rezultatele se obțin în 4-6 ore, iar colifagii se corelează mai bine cu enterovirusurile decât coliformii, este utilă efectuarea de cercetări

în continuare.

Posibila utilizare a indicatorilor fecali. Utilizarea cu succes a coliformilor/coliformi fecali la evaluarea potabilității apei a dus la folosirea sa pe scară largă pentru determinarea siguranței microbiologice a alimentelor, iar utilitatea sa a fost extinsă nu numai la o mare diversitate de produse alimentare, dar şi la suprafețele şi ustensilele de manipulare a alimentelor.

Într-un studiu de 2 ani, efectuat în Italia pe probe de lăptuci şi chimen, pentru determinarea numărului de coliformi, coliformi fecali şi enterococi s-a arătat că aceste vegetale, care se folosesc ca atare, conțin între 3-4 log_{10}/100 g, pentru fiecare grup.

Tabelul 5.9

Alimente	**APC**	**Coliformi**	**Coliformi fecali**	**Enterococi**
Lăptuci	7.82	4.77	3.79	3.34
Chimen	6.37	4.89	3.89	3.49

Un studiu comparativ între numărul relativ de colifagi, coliformi fecali şi enterococi fecali a fost realizat pe 7 specii de animale, după cum este redat în tabelul 5.10.

Tabelul 5.10

Sursa	**Fagi RNA, F specifici**	**Colifagi somatici**	**Coliformi termotoleranți**	**Streptococi fecali**	**Spori de Clostridium**
Porc	$2.8x<10^{3}$	$3.4x10^{6}$	$3.0x10^{6}$	$7.3x10^{5}$	$6.4x10^{2}$
Pui broiller	$>1.2x<10^{6}$	$1.1x10^{7}$	$1.9x10^{8}$	$5.6x10^{5}$	$<10^{2}$
Câine	<10	$4.1x10^{4}$	$9.0x10^{7}$	$8.2x10^{5}$	$1.6x10^{6}$
Vacă	<10	$4.0x10^{5}$	$5.6x10^{5}$	$1.1x10^{5}$	$9.8x10^{2}$
Cal	<10	$2.2x10^{4}$	$1.8x10^{5}$	$1.3x10^{4}$	$<10^{2}$
Oaie	$1.9x10^{3}$	$3.1x10^{6}$	$1.2x10^{7}$	$1.3x10^{5}$	$<10^{2}$
Vițel	$5.8x10^{4}$	$2.2x10^{7}$	$3.2x10^{7}$	$1.1x10^{5}$	$8.0x10^{3}$
Om	$<10^{1}$	$6.1x10^{8}$	$1.9x10^{8}$	$3.7x10^{8}$	$> 1.8x10^{3}$

Nici fagul F specific şi nici fagii somatici, nu au fost găsiți în fecalele umane în număr apreciabil, iar numărul de coliformi fecali a fost egal în fecalele de om şi de porc.

Capitolul 6
Factorii de control ai creşterii microorganismelor

Microorganismele (virusuri, bacterii sau ciuperci) interacționează cu toate componentele mediului lor de viață: fizice, chimice sau biologice. Unele dintre ele se adaptează mai repede, altele mai lent sau chiar de loc, dar în toate situațiile fenomenele ce au loc la nivelul fiecărei populații microbiene sunt extrem de complexe. Se poate afirma că factorii de mediu influentează fundamental funcția enzimelor metabolice, iar supraviețuirea într-un mediu variabil reprezintă, în mare măsură, o problemă de flexibilitate enzimatică.

6.1. Influenţa temperaturii asupra microorganismelor

Unele microorganisme, cum sunt bacteriile, se adaptează şi multiplică în limitele temperaturilor mediului lor înconjurător, care poartă denumirea de temperaturi cardinale. Totuşi microorganismele se dezvotă în intervale termice specifice cunoscute cu o valoare minimă şi una maximă între acestea două găsinduse valoarea temperaturii optime de dezvoltare.

Bacteriile patogene suportă temperaturi ridicate numai între anumite limite. Acestea oscilează pentru forma vegetativă între 50 ^{o}C şi 70^{o}C. Între aceste limite celulele vegetative sunt omorâte prin acțiunea căldurii asupra proteinelor bacteriene într-un timp care depinde de specia bacteriană, densitatea populației, compoziția mediului şi pH-ul.

În cazul temperaturilor foarte ridicate, temeratura maximă, microorganismele sunt distruse instantaneu (efect microbicid), temperatura optimă sau intervalul de temparatură specifică unui microorganism este rezultatul adaptarii la mediu şi aceasta reprezintă zona termică la care speciile microbiene se dezvoltă în cele mai bune condiții, iar temperatura minimă este limita inferioară de rezistență termică a un microorganism, sub această valoarea fiind stopată creşterea microorganismelor (efect microbiostatic).

Indicatorii convenționali, folosiți pentru aprecierea termorezistenței în cazul bacteriilor patogene sunt reprezentați de: punctul termic mortal şi timpul termic mortal.

Tabel. 6.1.

Definirea zonelor termice de confort microbian

Intervalul termic	Influența temperaturii
Valori termice subminimale	Reducerea vitezei proceselor metabolice până la oprire: efect microbiostatic
Temperatura minimă	Influențează ușor favorabil
Temperatură optimă	Procese metabolice derulate la parametrii de maximă performanță
Temperatură maximă	Influențează ușor favorabil
Temperaturi subminimale	Coagularea proteinelor celulare:efect microbiocid

După temperatura optimă de dezvoltare, microorganismele se clasifică după cum urmează:

• Microorganisme criofile sau psihrofile (t<10°C): majoritatea mucegaiurilor, bacterii din geul *Pseudomonas*, drojdiile pentru obținerea vinurilor spumoase. Sunt importante în procesul de fabricare al vinului spumos şi ca agenți de alterare a resurselor naturale. Sisteme enzimatice ale microorganismelor psihorofile sunt active la temperaturi scazute. Bacteriile psihrofile (criofile) se multiplică între o limită inferioară determinată de posibilitatea mediului de a-şi menține starea de agregare lichida şi la 10°C. Acest tip se dezvoltă cel mai bine sub 15°C fiind în general incapabil să se dezvolte la temperaturi de peste 20°C. Incubarea trebuie efectuată într-o camera rece, iar culturile respective se pastrează la frigider. Bacteriile criofile adevărate sunt nepatogene şi trebuie diferențiate de cele psihrofile facultative care sunt de fapt organisme mezofile ce cresc lent în frig, temperatura lor optimă fiind cea de peste 20°C. După cum se poate prevedea, habitatele bacteriilor criofile sunt câmpiile acoperite cu zăpadă, gheața polară şi oceanele adânci. Strategia bacteriilor din ghețarii Oceanului Artic şi din Antartica este extrem de surprinzătoare. Deşi gheața apare ca o structură perfect compactă, ea se prezintă de fapt ca un fagure de miere, prezentând pori şi tuneluri de diferite dimensiuni umplute cu apă. În populațiile bacteriene mezofile din alimentele conservate prin frig pot apărea şi mutante criofile facultative, capabile de multiplicare în aceleaşi condiții cu bacteriile criofile adevarate.

• Microorganisme mezofile (t=10-45°C): bacterii acetice, majoritatea bacteriilor lactice, majoritatea bacteriilor saprofite şi patogene, majoritatea drojdiilor, virusuri. Sunt importante în procesul de fabricare al acidului acetic, fabricarea produselor lactice sau a acidului lactic, în fabricarea produselor alcoolice sau determină o serie de afecțiuni patologice (cele patogene). Majoritatea bacteriilor patogene şi a celor care fac parte din flora normală a organismului sunt mezofile (cresc la temperaturi moderate). Deşi un individ bacterian se poate dezvolta la temperaturi extreme de 10 sau 50°C, temperaturile optime de creştere

pentru majoritatea mezofililor se situează între 20 şi 40^{o}C. Acest tip de bacterii traieşte în animale şi plante precum şi în sol şi apă, în clime temperate, subtropicale sau tropicale. Temperaturile optime de creştere a majorității agenților patogeni se sintetizează între 30 şi 40^{o}C (în funcție de temperatura organismului respectiv, în general în apropierea temperaturii de 37 ^{o}C).

• Microorganisme termofile (t>45^{o}C): bacterii butirice, bacterii lactice din genul *Thermobacterium*, drojdii din genul *Schizosaccharomyces*, bacterii din gunoiul fermentat, bacterii din furaje însilozate, virusuri. Sunt importante în procesele de alterare, la fabricarea unor produse lactate, acidulări industriale, fabricarea unor băuturi în regiunile cuu climă caldă, sterilizarea biotermică a gunoiului de grajd, însilozarea furajelor, obținerea enzimelor termostabile, purificarea apelor reziduale, bioindicatori ai tratamentelor termice, pot produce o serie de boli. Sistemele enzimatice ale microorganismelor termofile sunt active şi stabile la temperaturi ridicate. Unele bacteriile termostabile pot supraviețui o scurtă perioadă de timp la temperaturi înalte, în mod normal fiind mezofile, acestea sunt contaminantele obişnuite ale alimentelor încălzite sau pasteurizate, fiind deseori sporogene. Bacteriile termofile se dezvoltă optim la temperaturi de peste 45^{o}C, temperatura optimă fiind cea de 60^{o}C. Bacteriile termofile au de regulă ca nişă ecologică soluri şi ape cu activitate vulcanică, precum şi habitate expuse direct soarelui (platforme de bălegar). Majoritatea speciilor se dezvoltă între 45 şi 80^{o}C, iar unele pot supraviețui chiar la aproximativ 250^{o}C (această cifră este considerată temperatura limită tolerată de protoplasmă). Temperatura influențează unele activități vitale ale bacteriilor, cum ar fi: multiplicarea, elaborarea unor toxine şi enzime, sporogeneza etc. Multe dintre speciile termofile sunt sporogene şi mai puține dintre ele sunt patogene. Rezistența acestor bacterii se bazează pe toleranța la temperaturi ridicate a constituenților celulari esențiali precum şi a capacitații deosebite de resintetizare rapidă a constituenților celulari alterați prin caldură. Unele dintre habitatele cu cele mai extreme sunt izvoarele fierbinți, gheizerele, canalele şi gurile de aerisire ale oceanelor. Temperaturile din aceste locuri variază de la 50^{o}C până la temperaturi situate cu mult deasupra punctului de fierbere al apei, apropiindu-se de 350^{o}C în unele canale de aerisire ale oceanelor. Majoritatea bacteriilor adaptate la căldură sunt organisme extrem de primitive (arhebacterii). Un ecosistem absolut unic, bazat pe bacterii care oxidează hidrogenul sulfurat există în gurile de ventilație hidrotermale din adâncurile oceanelor. Bacteriile adaptate termic colonizează chiar şi sistemele de încălzire a apei din gospodării (boilere) sau turnurile de încălzire şi instalațiile de răcire cu apă din centralele electrice şi uzinele industriale.

Indicatorii convenţionali, folosiţi pentru aprecierea termorezistenţei în cazul bacteriilor patogene sunt reprezentaţi de: punctul termic mortal şi timpul termic mortal. Punctul termic mortal se exprimă prin temperatura la care sunt omorâte în zece minute toate celulele dintr-o populaţie ce aparţine unei specii bacteriene date. Timpul termic mortal reprezintă timpul de expunere în care sunt omorâte toate celulele unei populaţii dintr-o specie bacteriană la o temperatură constantă dată.

Sporii bacterieni rezistă la temperaturi supramaximale, mult mai ridicate decât celulele vegetative, fiind distruşi la 120^{o}C, căldură umedă şi 180^{o}C, căldură uscată.

Temperatura minimă reprezinta limita cea mai joasă care permite unei bacterii să-şi continue creşterea şi activitatea metabolică; sub aceste limite activităţile sale sunt în general inhibate. Temperatura scăzută produce în majoritatea cazurilor o acţiune pozitivă asupra bacteriilor. S-a constatat că unele specii pot supravieţui chiar la temperatura de îngheţ a aerului (-190 ^{o}C) sau a heliului (-250 ^{o}C).

Gradul de nocivitate al temperaturilor scăzute este cu atât mai redus cu cât înghetul se produce mai brusc. Cauza morţii celulelor supuse temperaturilor subminimale constă în efectul deshidratant al îngheţului care atrage după sine concentrarea electroliţilor din celulă precum şi acţiunea mecanică a cristalelor de gheaţă. Efectul conservant a1 frigului asupra bacteriilor şi-a găsit aplicaţii practice în metodologia păstrării acestora în colecţii prin congelare (-70; -30 ^{o}C) sau prin liofilizare (îngheţarea bruscă a materialului microbian la temperatura zăpezii carbonice urmat de uscarea acestuia în vid).

Temperatura maximă reprezintă temperatura cea mai ridicată la care poate avea loc creşterea şi multiplicarea bacteriilor. Dacă, temperatura continuă, însă, să crească peste această limită, activitatea metabolică se va opri, iar celula va muri.

Temperatura optimă cuprinde o gamă redusă intermediară între nivelul minim şi cel maxim, cu rata cea mai rapidă de creştere şi metabolizare. În funcţie de habitatele lor naturale unii microbi se dezvoltă între limite destul de largi ale temperaturii cardinale în timp ce în cazul altora aceste limite sunt mai înguste. De exemplu, bacteriile strict parazite sau obligatorii nu se dezvoltă dacă temperatura variază mai mult decât cu câteva grade sub sau peste temperatura corpului gazdei. Rickettsiile se multiplică numai între 32 şi 38 ^{o}C.

Unii agenţi patogeni sunt extrem de stricţi sub raportul nevoilor lor de temperatură (ex.: gonococul se dezvoltă între 30 şi 40^{o}C, iar bacilul tuberculozei între 30 şi 42^{o}C). Alte bacterii patogene nu se pot dezvolta dincolo de un interval de zece grade. Există şi bacterii care se pot dezvolta în limite mai largi de temperatură. De exemplu, unele tulpini de stafilococ

care cresc între 6 şi 46°C sau *Enterococcus faecalis* între 5 şi 50°C.

Cunoscându-se modul cum temperatura influenţează metabolismul microbian, pot fi dezvoltate aplicaţii utilizând căldura în cultivarea industrială a microorganismelor utile la prepararea unor produse farmaceutice, alimentare, biopreparate şi produse de biosinteză sau utilizând frigul (temperatura de refrigerare şi congelare) în conservarea materiilor prime, produselor alimentare, vacinurilor etc. La congelare, apa liberă şi o parte din cea legată celular se transformă în cristale de gheaţă, creşte concentraţia în enzime, cu declanşarea fenomenelor caracteristice şocului osmotic şi instalarea modificărilor ireversibile în conformaţia macromoleculară şi perneabilitatea membranei celulare. Procesul determină distrugerea unor microorganisme, creând un mediu propice dezvoltării celor care au supravieţuit. La congelarea rapidă se produc cristale mici intra- şi extracelulare, ce crează distrugeri mai mari ale celulelor microbiene, decât congelarea lentă. La congelarea lentă (3-72 ore), apa migrează din celula microbiană în exterior, se formează cristale mari de gheaţă, care rup membranele celulare, distrugând celulele.

S-a observat că forma bacteriilor influenţează rezistenţa acestora la temperaturile minime, astfel cocii sunt mai rezistenţi la congelare decât bacilii. De asemenea sporii bacteriilor, toxinele si bacterile responsabile de toxiinfecti alimetare rezistă la congelare.

Denaturarea ireversibilă prin căldură a proteinelor celulare, acumularea produşilor de metabolism toxici şi inactivarea enzimelor sunt mecanismele prin care căldură distruge microorganismele. Uciderea microorganismelor prin căldură este una din principalele căi de conservare a produselor alimentare şi farmaceutice, de sterilizare a vaselor şi instrumentelor utilizate în laborator sau în sălile de operaţii, la pregătirea mediilor de cultură microbiană etc.

Inactivarea microorganismelor prin utilizarea temperaturilor supramaximale este depentă de timpul de expunere al acestora şi este influenţată de prezenţa sau nu a vaporilor de apă.

Conservarea cu ajutorul temperaturii supramaximale: face referire la fierbere, pasteurizare ($t<100°C$), sterilizare ($t>100°C$) sau tindalizare (2-3 pasteurizări repetate, alternante cu perioade de termostatare).

Tabelul 6.2.

Valorile minime de creştere ale unor bacterii

Microorganismul	**Temperatura minimă de creştere**
Vibrio	-5
Yersinia enterocolitica	-2
Enterococcus	0
Listeria monocytogenes	1

Microorganismul	Temperatura minimă de creştere
Clostridium botulinum	3,3
Salmonella	4
Staphylococcus	6,7

6.2. Influența gazelor atmosferice asupra microorganismelor

Cele trei gaze atmosferice care influențează creşterea microbiană sunt oxigenul, dioxidul de carbon şi hidrogenul. Dintre acestea oxigenul are cel mai mare impact asupra adaptării bacteriene. Bacteriile, în funcție de predispoziția lor de a trăi în prezența sau absența oxigenului, se clasifică în trei grupuri:

- bacterii strict aerobe;
- bacterii facultativ aerobe;
- bacterii anaerobe.

Bacteriile aerobe sunt microorganisme care într-o proporție însemnată se pot dezvolta şi reproduce numai în mediile care conțin oxigen. Bacteriile strict aerobe ca cele saprofite, nitrificatoare, o parte din sulfobacterii şi microbii patogeni trăiesc numai în prezența oxigenului molecular. Bacteriile facultativ aerobe, grupează la un loc unele drojdii, bacterii denitrificatoare s.a. Bacteriile anaerobe sunt organisme capabile să trăiască fără prezența oxigenului liber. Dintre acestea remarcăm infuzoriile, *Clostridium pasteurianum* şi *Clostridium sporogenius*. În strânsă asociere cu bacteriile, în procesele aerobe cohabitează o serie de protozoare, dintre care clasele *Flagellata, Sarcodia, Sporazoa, Ameobosporidia, Ciliophora* şi o serie de ciuperci sau chiar fungi.

În condiții normale la om în intestinul gros se găsesc câteva sute de specii de bacterii (în fecale se găsesc 10^{11}/g microorganisme). Majoritatea microorganismelor sunt anaerobe, totuşi unele au o toleranță față de oxigen care variază de la bacteriile metanogene de exemplu, strict anaerobe, la bacteroide şi bifidobacterii relativ tolerante. Bacteriile anaerobe depăşesc numărul speciilor aerobe (~1000).

Procariotele sunt capabile să colonizeze diverse habitate şi datorită faptului că ele dispun de diverse modalități de achiziționare a energiei şi nutrienților din mediul înconjurător. Spre exemplu, spre deosebire de eucariote, multe procariote sunt anaerobe, metabolismul lor nu solicită oxigen molecular. Abilitatea lor de a popula medii fără oxigen permite procariotelor să exploateze habitate limitative pentru eucariote. Unele procariote, aşa cum sunt arhebacteriile găsite în izvoarele termale şi bacteriile responsabile de producerea tetanosului sunt ucise de oxigen. Altele sunt oportuniste, angajându-se în respirația anaerobă când oxigenul

lipseşte şi comutând pe respirația aerobă (un proces mult mai eficient) când oxigenul devine disponibil. Desigur, multe procariote sunt strict aerobe şi solicită oxigen tot timpul.

6.3. Influența pH-ului asupra microorganismelor

Gradul de aciditate sau de alcalinitate al unei soluții poate fi exprimat printr-un sistem de evaluare chimică, numit scara pH (valoarea concentrației ionilor de hidrogen, care se încadrează între 1 şi 14). pH-ul apei pure este neutru (7,0), nici acid, nici bazic. Pe măsură ce pH-ul scade (spre 0) creşte aciditatea, iar pe măsură ce acesta creşte (spre 14), se măreşte alcalinitatea. Majoritatea organismelor nu trăiesc şi nu cresc în habitate cu pH ridicat sau scăzut, deoarece atât acizii cât şi bazele au un efect nociv asupra enzimelor şi a altor substanțe celulare.

Valorile optime ale pH-ului se situează în cazul majorității microorganismelor între 6 şi 8, iar majoritatea bacteriilor patogene au un pH neutru (6,5-7,5). Unele bacterii pot trăi la pH-uri extreme. De exemplu, *Thermoplasma*, o bacterie fără perete celular care traieşte în grămezi de cărbuni fierbinți la un pH 1,0 - 2,0 şi care la pH 7,0 se lizează.
Bacteriile care descompun urina crează condiții alcaline, deoarece se poate produce amoniu (NH_4^+) (ion alcalin), când este digerată ureea. Habitatele cu aciditate sau alcalinitate mare, nu sunt obişnuite, însă mlaştinile şi lacurile acide sau solurile alcaline conțin o floră microbiană specializată. Există specii bacteriene care pot supraviețui în apropierea pH-ului acidului clorhidric concentrat. De exemplu, *Thiobacillus* nu numai că necesită pentru creştere un pH foarte mic (acid) însă sunt capabile în acelaşi timp să elibereze un acid puternic.

La om pH-ul secreției gastrice inactivează majoritatea virusurilor, cu toate acestea enterovirusurile supreviețuiesc condițiilor de pH oferite de tubul digestiv şi se replică în intestin. Speculând sensibilitatea virusurilor la pH, organismul reacționează la nivelul proceselor inflamatorii, unde pH-ul infiltratului inflamator produs este tot mic.

Fungii şi drojdiile reacționează evident la pH-ul mediului ambiental, modificându-şi metabolismul pe baza unor gene ce fac subiectul reglării prin pH-ul ambientului. Spre exemplu la *Aspergillus nidulans* aceste gene se clasifică în trei categorii: gene care codifică enzimele secretate în mediu, gene care codifică permeaze şi gene implicate în sinteza metaboliților exportați. Gene reglate de pH care codifică enzime secretate în mediu sunt *pacA* ce codifică fosfataza acidă, *xlnB* care codifică xilaza, *abfB* care codifică α-L-arabinofuranosidaza şi una sau mai multe gene care codifică fosfodiesteraze acide, toate expresate

preferențial în condiții de pH acid, precum şi *palD* ce codifică fosfataza alcalină, *prtA* ce codifică proteaza alcalină şi *xlnA* ce codifică xilanaza, toate expresate preferențial în condiții de creştere cu pH alcalin. Din categoria genelor reglate de pH care codifică permeaze este şi *gabA* ce codifică un transportor GABA ce are un pH acid optim şi se expresează preferențial într-un mediu acid. Dovezi indirecte susțin că molibdat permeaza este sintetizată preferențial în condiții de pH acid. Genele reglate de pH implicate în sinteza metaboliților exportați includ *acvA* o genă expresată preferențial în mediu alcalin care codifică δ-(L-{alpha}-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valinsintetaza şi *ipnA* tot o genă expresată preferențial în mediu alcalin care codifică isopenicilin N sintaza, acestea sunt primele două enzime ale biosintezei penicilinei. Iar genele expresate preferențial în pH acid implicate în sinteza metaboliților exportați sunt *stcU* care codifică ketoreductaza catalizând reducerea versicolorinului A şi participând la sinteza sterigmatocistinei toxice, care, la o serie de specii *Aspergillus,* este precursor al aflatoxinei. În plus, una sau mai multe activități implicate în toxicitatea aminoglicozidelor cum sunt neomicina şi kanamicina par a fi sub controlul pH-ului ambiental, respectiv tocicitatea creşte în condiții de creştere alcaline.

Din punt de vedere medical, cunoaşterea comportamentului fungilor funcție de pH permite elaborarea unor sisteme de reglare a pH-ului care vor putea preveni efectul patogen al acestora asupra animalelor şi/sau plantelor.

6.4. Influența presiunii osmotice asupra microorganismelor

Manifestarea presiunii osmotice are loc la nivelul unei membrane semipermeabile, care separă două soluții cu concentrații diferite şi care permite trecerea moleculelor solventului prin această membrană. Bacteriile pentru a se dezvolta în bune condiții au nevoie de o cât mai sensibilă egalizare a presiunii osmotice a mediului extern cu cea din interiorul celulei bacteriene. În condiții normale, presiunea osmotică externă este mai redusă decât cea internă datorită concentrației mari în săruri minerale şi substante organice a citoplasmei bacteriene în raport cu mediul.

Din punct de vedere fizico-chimic, celulele microbiene pot fi considerate ca soluții ale diferitelor substanțe, separate de mediul în care trăiesc printr-o membrană semipermeabilă (membrana celulară), care permite schimburile celulă-mediu şi la nivelul căreia se manifestă presiunea osmotică.

Tabelul 6.3.

Efectul osmotic

Presiunea osmotică a mediul exterior celulei	**Descrierea efectului osmotic**
Isotonic = 0,9% săruri	Intră şi ies cantități egale de apă.
Hipotonic < 0,9% săruri	Apa are tendința de a intra, compresiunea peretelui. Nu sunt probleme dacă peretele este intact (poate suporta 20 de atmosfere).
Hipertonic > 0,9% săruri	Apa are tendința să iasă afară, secarea celulelor până la plasmoliză. Se opreşte metabolismul

Diferențele mari de presiune osmotică dintre citoplasmă şi mediu, cât şi variațiile bruşte ale acesteia determină modificări care pun în pericol viața celulei bacteriene.

În medii hipotone, se produce fenomenul de plasmoptoză, datorită pătrunderii apei din exterior putând duce uneori la plesnirea celulei şi difuziunea conținutului ei în mediu.

În medii hipertone, se produce plasmoliză, prin trecerea apei din celulă în mediu, iar citoplasma se retractează depărtându-se de peretele celular care işi păstrează forma datorită rigidității sale structurale.

Bacteriile osmofile sau halofile constituie o excepție prin faptul că preferă mediile hipertone. Din această categorie fac parte bacteriile halofile obligatorii ca de exemplu *Halobacterium* şi *Halococcus* care traiesc în lacuri şi bălți cu o concentrație mare de sare. Ele cresc cel mai bine în medii cu clorură de sodiu 25%, dar necesită pentru supraviețuire o concentrație de cel putin 15% clorură de sodiu în combinație cu alte săruri. Este demonstrat că aceste bacterii au nevoi crescute de minerale, cum ar fi sodiu, potasiu, magneziu, cloruri sau ioduri.

Unele bacterii, deşi nu trăiesc în medii cu o concentrație mare de sare, prezintă o rezistență considerabilă la aceasta. De exemplu, *Escherichia coli* conține în spațiul periplasmic o soluție osmotic activă care răspunde la modificările mediului împiedicând umflarea celulei.

Streptomicetele, bacterii Gram pozitive miceliene, prezintă un interes particular prin morfologia lor complexă şi capacitatea de a produce o varietate de compuşi biologici activi cum sunt antibioticele, imunomodulatorii, inhibitori enzimatici şi enzime hidrolitice. Unul dintre cei mai utilizați promotori ai biotehnologiilor ce utilizează streptomicetele este *ptipA*. Acesta este în mod evident influențat de osmolaritatea mediului ambiental, potențarea efectului său fiind realizată prin creşterea osmolarității extracelulare (a mediului de cultură).

6.5. Influența presiunii hidrostatice asupra microorganismelor

Majoritatea bacteriilor suportă presiuni de până la 200-600 atmosfere. Bacteriile barofile trăiesc pe fundul mărilor şi oceanelor, fiind supuse unor presiuni hidrostatice mari. Ele reprezintă o excepție, deoarece sunt capabile să se multiplice la presiuni foarte ridicate ce ajung la valori de până la 1000 atmosfere şi chiar mai mult.

Cultivate în condiții de laborator, bacteriile barofile izolate de pe fundul oceanelor de la adâncimi de peste 10.000 metri, au putut fi cultivate la presiunea de 1400 atmosfere. Aceste bacterii sunt atât de strict adaptate la presiuni înalte, încât se vor sufoca dacă vor fi expuse la presiunea atmosferică normală. Teoretic temperatura scăzută şi presiunea ridicată din adâncurile mărilor şi oceanelor reduc fluiditatea lipidelor şi implicit diminuează funcțiile biologice ale membranelor celulare. Dar, s-a observat că barofitele posedă anumite mecanisme care permit lipidelor lor să se adapteze la mediul oferit de adâncul mărilor şi oceanelor. În fapt, la o tulpină barofitică sa observat că o creştere a presiunii are ca rezultat creşterea nivelului acizilor graşi nesaturați din lipide, sugerând o adaptare homeovâscozitară ca răspuns la presiune. În general, se consideră că bacterile nu sunt incapabile să producă acizi graşi polinesaturați (AGPN). La un număr mare de tulpini bacteriene izolate din mediul terestru sau marin s-a raportat că produc acizi graşi cu lanțuri mai mici de 20. Totuşi, la bacteriile marine cum sunt cele izolate din adâncul mărilor şi izolatele barofilice s-a identificat prezența AGPN cum sunt acizii docosahexaenoic şi eicosapentaenoic. AGPN au un punct de topire relativ scăzut şi deci acestea pot ajuta la menținerea fluidității optime a lipidelor membranare necesare bacteriilor marine pentru a se adapta la mediul din adâncul mărilor.

6.6. Influența energiei radiante asupra microorganismelor

Un alt tip de energie cu efecte antimicrobiene îl constituie radiațiile. Radiațiile ar putea fi definite ca fiind orice formă de energie rezultată (emisă) din activități atomice, ce trece cu viteză mare prin materie sau spațiu. Cu cât lungimea de undă a radiațiilor este mai mare, cu atât acțiunea antibacteriană este mai redusă şi invers. Pornind de la limita superioară de 12.000 A, pe măsură ce lungimea de undă se micşorează, efectul antibacterian al radiațiilor creşte din ce în ce mai mult în intensitate.

Diferite forme de radiații electromagnetice (ultraviolete, infraroşii, lumina vizibilă) ajung în permanență pe pământ de la soare. Bacteriile fototrofe pot utiliza în metabolism energia luminoasă a soarelui, însă cele

nefotosintetizante tind să fie lezate de către produsele toxice de oxigen rezultate din contactul cu lumina. Unele specii bacteriene, cum ar fi stafilococul auriu (*Staphylococcus aureus*) produc un pigment carotenoid galben care protejează bacteria împotriva efectelor lezante ale luminii prin absorbția şi distrugerea oxigenului toxic. Alte tipuri de radiații toxice pentru bacterii sunt cele ultraviolete şi ionizante (raze X şi radiații cosmice).

Cele două forme principale de radiații folosite în controlul microbian sunt radiațiile electromagnetice şi cele corpusculare (particulare).

Radiațiile electromagnetice se comportă ca nişte unde, spectrul lor variind de la radiațiile gama de mare energie, cu lungime de undă scurtă, la o extremitate, până la radiații de mică energie, cu lungime de undă foarte mare, la cealaltă extremitate.

În general, numai radiațiile electromagnetice de nivelul radiațiilor gama, razelor X (numite şi Roentgen) şi radiațiile ultraviolete (UV) sunt adecvate pentru controlul microbian.

Pentru a întelege efectele fizice reale ale radiațiilor asupra bacteriilor va fi utilă vizualizarea procesului de iradiere sau bombardarea cu radiații la nivel celular. Când o celulă este bombardată de anumite unde sau particule, moleculele sale absorb o parte din energia liberă, ceea ce poate avea următoarele consecințe:

- dacă radiația dezintegrează structura atomică a moleculelor prin dislocarea şi ejecția de electroni orbitali rezultatul constă într-un dezechilibru electronic şi în formarea de ioni. Aceasta este radiația ionizantă. Una dintre țintele cele mai sensibile pentru radiația ionizantă este molecula de ADN, care poate suferi mutații pe scară largă. Efectele secundare letale se dovedesc a fi modificări chimice ale organitelor şi producerea de substanțe toxice. Efecte ionizante au radiațiile gama, razele X şi electronii de mare viteză.
- Radiațiile neionizante sunt cel mai bine exemplificate de radiațiile UV, excită atomii ridicându-i la un nivel energetic superior, însă nu-i ionizează.

Această excitație atomică, la rândul sau, duce la legături anormale în interiorul unor molecule cum ar fi cele de ADN, producând mutații.

În ultimii ani, utilizarea radiațiilor ionizante a devenit mai sigură şi mai economică, iar aplicațiile lor s-au înmulțit foarte mult. Acestea reprezintă o alternativă foarte eficientă pentru sterilizarea materialelor sensibile la caldură sau la substanțe chimice. Deoarece radiațiile acționează în absența căldurii, sterilizarea produsă de ele este uneori denumită sterilizare la rece.

Dispozitivele care emit radiații ionizante includ aparate de radiații

gama ce conțin cobalt radioactiv, aparate de raze X similare celor folosite pentru diagnosticul medical şi aparate de raze catodice care funcționează cu un tub electronic cu vid (vacuum) al unui televizor. Obiectele sunt plasate în aceste aparate şi iradiate un timp scurt, doza fiind aleasă cu grijă. Doza se măsoară în razi (radiation absorbed dose = doza de radiație absorbită). În funcție de aplicație expunerea variază între 0,5 şi 5 megarazi (Mrazi; 1 megarad = 1.000.000 razi).

Toate radiațiile ionizante pot pătrunde prin lichide şi solide, însă radiațiile gama sunt cele mai penetrante, razele X sunt intermediare, iar razele catodice cel mai puțin penetrante. Bacteriile cele mai rezistente la radiații sunt anumiți coci Gram pozitivi (*Deinococcus*) şi sporii bacterieni. Celulele bacteriene vegetative sunt extrem de sensibile la radiații.

Deinococcus radiodurans a fost descoperit în 1956 de Arthur W. Andersdon la Stația de Experimente Agricole Oregon, şi este considerată cea mai rezistentă celulă bacteriană vegetativă la acțiunea radiațiilor. Abilitatea bacteriei de a supraviețui în condiții extreme (radiații şi substanțe chimice genotoxice, distrucțiilor oxidative şi deshidratării) este atribuită abilității acesteia de a-şi reface cromozomii. Este cunoscut că prin încălzire, deshidratare sau iradiere este posibilă ruperea celor două lanțuri oligonucleotidice ale moleculei de ADN cromozomial. *D. radiodurans* va repara aceste fragmente cromozomiale, uzual în 12-24 ore, utilizând două procese, cel din urmă fiind de o importanță crucială. Inițial, *D. radiodurans* utilizează un proces denumit aliniere monostrat pentru a reconecta unele fragmente de cromozom. Apoi, *D. radiodurans* utilizează un proces cunoscut ca recombinare omologă, unde o proteina *Reca* repară cele două straturi. Proteina *Reca* taie fragmente de ADN utilizate într-o altă moleculă şi le inseră în stratul lezionat (acest lucru este posibil întrucât genele sunt împachetate în patru cromozomi circulari distincți). În plus față de acest mecanism *D. radiodurans* mai posedă pigmenți carotenoizi, sistem enzimatic de anihilare a acțiunii toxice a oxigenului şi o membrană externă distinctă. Dintre acestea, prezența peretelui celular multistratificat (trei sau mai multe straturi) cu o membrană lipidică externă şi un strat peptidoglicanic gros, ce conține aminoacidul omitidină, de asemenea serveşte la protecția celulei bacteriene față de dozele letale de radiații.

De-a lungul anilor diferite agenții au experimentat folosirea radiațiilor ionizante în dezinfecții şi sterilizarea alimentelor. Problemele care apar în mod inevitabil în cazul alimentelor iradiate sunt modificările de aromă şi valoare nutritivă cât şi posibilitatea introducerii unor produse secundare nocive rezultate din reacțiile chimice. Aceste dezavantaje au fost diminuate prin utilizarea unor doze minime şi prin efectuarea procesului în camere foarte reci şi fără oxigen. Alimentele care se

sterilizează prin această metodă sunt carnea afumată, precum şi unele mirodenii şi condimente. Mai frecvent iradierea este folosită pentru diminuarea încărcăturii microbiene. De exemplu, pot fi iradiate: carnea proaspătă de porc, carcasele de pui pentru controlul speciilor din genul *Salmonella*, fructe şi legume proaspete.

Sterilizarea produselor medicale cu radiații ionizante constituie un domeniu care se extinde rapid. Astfel, diverse medicamente, vaccinuri, pulberi, instrumente medicale (în special din materiale plastice), seringi, materiale de sutură, bureți, mănuşi chirurgicale şi țesuturi (oase, cartilaje, piele şi valvele cardiace pentru grefe) se pretează la acest mod de sterilizare. Avantajele principale ale acestei metode constau în rapiditate, putere de penetrare mare (poate steriliza materiale prin pachete şi ambalaje). Dezavantajele principale sunt pericolele potențiale pe care expunerea la radiații le prezintă pentru operatori şi posibila deteriorare a unor materiale. Contrar convingerii populare, prin radiațiile folosite în acest mod alimentele şi alte materiale nu devin radioactive.

6.6.1. Influența radiațiilor corpusculare asupra microorganismelor

Sunt constituite din particule subatomice, ca electroni, protoni şi neutroni, care au fost eliberați din atom. Singura radiație corpusculară utilizată pentru aplicații antimicrobiene este electronul de mare viteză (numit şi particulă β sau rază catodică).

Atât radiațiile electromagnetice cât şi cele corpusculare există în mod natural în univers, putând fi produse şi prin mijloace artificiale.

6.6.2. Influența radiațiilor luminoase asupra microorganismelor

Reprezintă o formă compusă de energie radiantă, iar efectul lor constă în rezultatul unor acțiuni sinergice dar şi al unor interferente.

Lumina exercită efecte diferite asupra bacteriilor în funcție de tipul nutritiv al acestora, fiind indispensabilă fototrofelor. Asupra bacteriilor chimiotrofe (chimioorganotrofe) are însă un efect bactericid care se exercită cel mai activ în cazul luminii solare directe.

Lumina naturală poate avea uneori o acțiune de contracarare sau de remediere a efectelor nocive provocate de iradierea cu ultraviolete a unor populații bacteriene. Această acțiune poate îmbrăca următoarele forme: fotoprotecția care constă în alternarea efectului iradierii cu ultraviolete şi fotoreactivarea (fotorestaurația) prin care se realizează recuperarea unei părți din celule pe cale de a fi omorâte datorită iradierii cu ultraviolete. Acest fenomen are loc dacă imediat după ultraviolete, materialul microbian este expus la lumină.

Fotosensibilizarea constă în intensificarea acțiunii antibacteriene a unor substanțe inactive la întuneric, având un efect invers în raport cu fotoprotecția şi fotoreactivarea.

Lumina vizibilă exercită unele efecte antimicrobiene, însă nu este suficient de previzibilă în ceea ce privesc efectele sale de control asupra tuturor microbilor.

Radiațiile infraroşii pot fi distructive prin caldura pe care o produc, însă au mai puține aplicații decât alte metode termice.

Microundele, de asemenea, par să omoare microorganismele prin producerea căldurii, dar efectele antimicrobiene ale undelor radio lungi sunt minime.

Un laser este o sursă de lumină, dar total diferită față de un bec normal. Cuvântul LASER provine din limba engleză, el fiind ancronimul pentru „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation". Diferența dintre lumina emisă de un bec normal şi un laser este ca şi aceea dintre zgomotul alb şi un ton curat. Principiile de funcționare ale laserului au fost enunțate în 1916 de Albert Einstein, printr-o evaluare a consecințelor legii radiației a lui Max Planck şi introducerea conceptelor de emisie spontană şi emisie stimulată, dar primul laser funcțional a fost construit de Theodore Maiman abia în 1960. Laserul este un dispozitiv optic care generează un fascicul coerent de lumină. Fasciculele laser au mai multe proprietăți care le diferențiază de lumina incoerentă produsă de exemplu de Soare sau de becul cu incandescență: monocromaticitate (spectru foarte îngust de lungimi de undă); direcționalitate (propagare pe distanțe mari cu o divergență foarte mică şi capacitatea de a fi focalizate pe o arie foarte mică); intensitate (unii laseri sunt suficient de puternici pentru a fi folosiți la tăierea metalelor).

Lasere cu elemente solide (materiale cristaline sau amorfe, de obicei amorsate cu ajutorul lămpilor cu xenon sau a laserelor semiconductoare) au lungimea de undă în spectrul de la infraroşu (1064,0 nm - Nd tratat) până în spectrul vizibil (694,1nm rubin). Puterea acestor lasere ajung în domeniul pentawatților (cele care lucrează în impulsuri), dar în medie au în jur de 1000W, motiv pentru care principala lor destinație este prelucrarea materialelor (găurit, tăiat, sudură, ajustare), studierea fuziunii nucleare, spectroscopie şi exercită un efect bactericid instantaneu asupra populațiilor bacteriene.

6.6.3 Influența radiațiilor neionizante asupra microorganismelor

Lumina solară reprezintă sursa naturală a radiațiilor ultraviolete, iar aceasta explică efectele sale germicide.

Absorbția majorității radiațiilor UV din lumina solară de către

atmosferă împiedică resimțirea întregii sale intensități şi ca atare limitează utilizarea sa practică. Lungimile de undă ale radiațiilor UV se situează între aproximativ 100 şi 400 nm. Efectele sunt letale în special între 240 şi 280 (cu un vârf de 260 nm). În practica de fiecare zi, sursa de radiații UV o constituie lampa germicidă, care generează radiații de 254 nm.

Din cauza stării lor energetice inferioare, radiațiile UV nu sunt atât de penetrante ca radiațiile ionizante.

Deoarece radiațiile UV trec uşor prin aer, în mică masură prin lichide şi extrem de puțin prin solide, obiectul ce urmeaza să fie dezinfectat trebuie să fie expus direct acestui tip de radiație.

Când radiația UV trece printr-o celulă, ea este inițial absorbită de ADN, ceea ce are drept urmare stoparea reproducerii. O leziune moleculară specifică se produce asupra bazelor pirimidinice (timină şi citozină), ce sunt atât de afectate de radiațiile UV, încât formează legături anormale numite dimeri pirimidinici.

Faptul ca aceştia se produc între baze adiacente pe acelaşi lanț de ADN împiedicând replicarea şi transcrierea normală a ADN-ului, explică inhibarea creşterii şi moartea celulară. Pe lângă alterarea ADN-ului radiațiile UV dezintegrează celulele prin producerea unor substanțe fotochimice toxice (radicali liberi). Datorită pericolului lezării universale produsă de radiațiile UV, ele reprezintă un mijloc puternic de distrugere a celulelor şi a sporilor. Sporii bacterieni sunt de aproximativ zece ori mai rezistenți la radiații decât celulele vegetative, însă pot fi omorâți prin creşterea timpului de expunere.

Metodele de control care folosesc radiații UV au ca obiectiv principal dezinfecția, mai degrabă decât sterilizarea. Ele sunt utilizate pentru reducerea contaminanților transmişi prin aer în saloanele spitaliceşti, săli de operatie, şcoli, spații de preparare a hranei, camine de spital şi barăci militare.

Dezinfecția aerului cu UV s-a dovedit eficientă în reducerea infecțiilor postoperatorii şi în limitarea creşterii microbilor în instalațiile de prelucrare a alimentelor şi în abatoare. În cursul acestor proceduri lămpile germicide sunt plasate pe pereți sau pe tavan pentru a împiedica o expunere excesivă a persoanelor din cameră. Lampile cu UV pot fi de asemenea plasate în țevile de încălzire şi de condiționare a aerului. Prin utilizarea acestei metode concentrația microbilor transmişi prin aer este diminuată într-o proporție de până la 99%.

Iradierea cu UV necesită o aparatură specială pentru a răspândi lichidul într-o peliculă subțire, fluidă care este expusă direct unei lămpi. Această metodă poate fi utilizată pentru tratarea apei potabile (în locul clorinării) cât şi pentru purificarea altor lichide (lapte, suc de fructe, vin şi bere) ca o alternativă pentru caldură.

Tratamentul cu UV s-a dovedit eficient în îndepărtarea contaminanților din antigene vaccinale şi plasmă. Suprafețele unor materiale solide neporoase ca: pereți, podele, contoare, cristale chimice, carne, mici, țesuturi pentru transplantare şi medicamente, au fost de asemenea dezinfectate eficient cu UV.

Un dezavantaj major al radiațiilor UV constă în puterea lor foarte redusă de penetrare. Ele nu pătrund satisfăcător în materiale opace ca: sticlă, metale, țesături, materiale plastice şi chiar hârtie.

Un alt dezavantaj al radiațiilor UV este efectul nociv asupra țesuturilor umane expuse excesiv la care provoacă arsuri solare, leziuni retiniene, cancer şi riduri cutanate.

6.7. Influența undelor sonore asupra microorganismelor

Se ştie că undele sonore de înaltă frecvență (sonice), dincolo de sensibilitatea urechii umane produc spargerea celulelor. Aceste frecvențe se situează între 15000 şi peste 200000 Hz (de la supersonic până la ultrasonic). Astfel de vibrații transmise printr-o cameră umplută cu apă (sonicator) induc modificări de presiune şi formarea unor minuscule cavități asemanatoare unor bule din lichide, fenomen numit cavitație. Bulele, care au o viață scurtă, se umflă şi creează puncte întense de turbulență, care pot deforma şi rupe celulele din vecinătate. Bacilii Gram negativi sunt foarte sensibili la vibrațiile ultrasonice, în timp ce cocii Gram pozitivi şi sporii bacterieni sunt foarte rezistenți la aceste vibrații. Sonicarea (tratarea cu ultrasunete a unor structuri sau molecule în vederea dezintegrării acestora) nu ajută doar la distrugerea unor microbi ci şi la dislocarea cu putere a materiilor străine din obiecte.

Căldura generată de undele sonice (până la 80^{o}C) contribuie de asemenea la acțiunea antimicrobiană. Dispozitivele ultrasonice se folosesc în cabinetele stomatologice şi în unele cabinete medicale pentru îndepărtarea detritusurilor şi salivei de pe instrumente înainte de sterilizare şi pentru curațirea obturațiilor dentare. Unele tipuri de aparate ultrasonice se folosesc în stabilirea diagnosticului medical şi pentru îndepărtarea plăcii bacteriene şi a tartrului dentar.

6.8. Influența unor compuşi chimici asupra microorganismelor

Compus chimic cu rol esențial în hrănirea microorganismelor şi în derularea normală a transformărilor enzimatice şi metabolice este apa. Scăderea umidității mediului în care se dezvoltă microorganismele are efect microbiostatic. Necesarul de apă este propriul fiecărei grupe de microorganisme: bacteriile (forme vegetative) au nevoie de minimum 30%

umiditate, drojdiile şi mucegaiurile, de minimum 10%; spori bacterieni sunt mai rezistenți la scăderea umidității. Cunoscând aceste cerințe ele pot fi exploatate la conservarea prin deshidratare a materiilor prime animale şi vegetale, a furajelor, alimentelor, produselor farmateutice, industriale etc. prin zvântare sau deshidratare cu ajutorul căldurii asociată cu ambalarea ermetică în materiale impermeabile, care asigură conservabilitatea în timp a acestora.

Bacteriile reacționează față de substanțele chimice prin următoarele mecanisme:

- indiferența față de substanța respectivă;
- utilizarea acesteia ca sursă nutritivă;
- intensificarea unor activități biologice datorită efectului ei biostimulator;
- migrarea bacteriilor spre substanța atractantă datorită unui chimiotactism pozitiv;
- îndepărtarea bacteriilor de repelent datorită unui chimiotactism negativ;
- dereglarea unor activități vitale până la moartea celulei (efect antibacterian).

După natura efectului antibacterian substanțele chimice se pot clasifica astfel:

- bacteriostatice, când produc dereglari reversibile ce duc la încetarea diviziunilor celulare;
- bactericide, care au un efect ireversibil, producând moartea bacteriilor.

Efectul antibacterian este dependent de următorii factori:

- substanța ca atare: există substanțe chimice care au efect bacteriostatic (ex.: acidul boric) şi substante cu efect bactericid, chiar în concentrații foarte mici (biclorura de mercur);
- concentrația (doza): majoritatea substanțelor chimice au efect bacteriostatic în doze mici şi bactericid în doze mari;
- forma biologică: celula vegetativă este mai sensibilă la acțiunea acestor substanțe decât endosporul. De exemplu, substanțe ca glicerina sau cloroformul sunt active față de celula vegetativă dar sunt inactive față de spor.
- specia bacteriană: de exemplu, pencilina este activă față de bacteriile Gram pozitive, dar nu şi față de majoritatea celor Gram negative; substanțele ca hidrazida acidului izonicotinic, acidul paraaminosalicilic sunt active față de bacilii tuberculozei.

După specificitatea acțiunii, substanțele antibacteriene se clasifică în:

• substanțe cu acțiune specifică, ce se utilizează *in vivo* în tratament, ce sunt reprezentate de produse chimice de sinteză (chimioterapeutice) sau de produse de secreție obținute din materiale biologice de natură bacteriană, fungică, vegetală sau animală (antibiotice). În infecțiile în care este posibilă izolarea agentului etiologic se recomandă testarea sensibilității acestuia față de mai multe antibiotice consecutiv (antibiograma). Tratamentul cu astfel de substanțe poartă denumirea de antibioterapie.

• substanțe cu acțiune specifică utilizate numai *in vitro* al căror efect nociv se exercită în mod egal atât față de celula bacteriană cât şi față de cea animală. Acestea sunt reprezentate de dezinfectante (principalii agenți sterilizanți chimici) şi de către antiseptice cu acțiune mai slabă, având un efect predominant bacteriostatic (utilizate în tratamente externe pentru antisepsia pielii sau mucoaselor).

Pe baza indicelui sau coeficientului fenolic se apreciază activitatea antimicrobiană a antisepticelor şi dezinfectantelor. Acesta exprimă cifric, de câte ori o substanță este mai activă sau din contră, mai puțin activă decât fenolul (etalonul convențional) fața de o specie bacteriană dată.

După mecanismul de acțiune, substanțele antibacteriene se clasifică în patru grupe:

• Substanțe care modifică permeabilitatea învelişului, reprezentate de săpunuri, detergenți şi fenol. Aceste substanțe produc modificări fizico-chimice care determină pierderea permeabilității selective a învelişului. Săpunurile diminuă tensiunea superficială, detergenții dizolvă lipidele, iar fenolul acționează şi prin alterarea proteinelor având un efect antibacterian mult mai puternic.

• Substanțe care produc alterarea proteinelor, din care fac parte acizii (acționează prin ionii de hidrogen: H^+), bazele (acționează prin ionii OH^- disociați, care determină gradul de alcalinitate al mediului) şi alcoolii care au o acțiune antibacteriană slabă, direct proporțională cu greutatea moleculară a acestora.

• Substanțe care acționează prin interferare cu grupările active ale enzimelor, reprezentate de sărurile metalelor grele (mercur, cupru, argint) cu efect intens bactericid; agenți oxidanți (clorul, iodul, peroxizii); formaldehida (formol sau formalina; reacționează cu radicalii NH_2 şi OH).

• Substanțe cu structură asemănătoare stereochimic, care acționează prin inhibiție competitivă, reprezentate de sulfamide. Acestea produc blocarea sintezei acidului folic (factor de creştere pe care bacteriile şi-l sintetizează singure). De exemplu, nucleul diparaaminobenzen-sulfamidă se aseamană şi poate fi confundat de bacterii cu acidul paraaminobenzoic care intră în compoziția acidului folic.

Agenţii chimici antimicrobieni cei mai importanţi sunt reprezentaţi de: halogeni, metale grele, alcooli, compuşi fenolici, oxidanţi, aldehide, detergenţi şi unele gaze.

6.8.1. Influenţa halogenilor asupra microorganismelor

Halogenii (Gr. *halos*, sare; Gr. *gennan*, a produce) sunt elemente chimice nemetalice fiind reprezentaţi de fluor, clor, brom şi iod. Pot exista atât în stare ionică (halogenuri), cât şi în stare neionică; îşi exercită mai bine efectul antimicrobian în stare neionică (de exemplu: clor, iod).

Fluorul şi bromul se mânuiesc greu şi periculos şi nu prezintă o eficienţă mai mare decât clorul şi iodul. De aceea, se preferă folosirea acestora din urmă în preparatele germicide, fiind componente extrem de eficiente ale dezinfectantelor şi antisepticelor, deoarece sunt nu numai bacteriostatice, dar şi bactericide; în cazul expunerii prelungite sunt şi sporicide. Datorită acestui fapt, folosirea halogenilor ca ingrediente active reprezintă o treime din totalul substanţelor comercializate în mod curent.

Clorul se foloseşte de aproximativ 200 de ani în dezinfecţie şi antisepsie. Principalele forme utilizate în controlul microbian sunt clorul lichid şi gazos (Cl_2), hipocloriţii (OCl) şi cloraminele (NH_2Cl). În soluţii aceşti compuşi se combină cu apă eliberând o substanţă foarte activă şi anume acidul hipocloros (HOC1). Această substanţă oxidează gruparea sulfhidril (S-H) a aminoacidului cisteină şi interferă punţile disulfidice (S-S) a numeroase enzime.

Denaturarea enzimelor este permanentă, având loc suprimarea reacţiilor metabolice.

Principalele dezavantaje ale folosirii produselor pe bază de clor în dezinfecţie sunt reprezentate de faptul că: sunt ineficiente dacă sunt folosite la un pH alcalin; substanţele organice în exces pot reduce în mare măsură activitatea lor, iar dacă sunt expuse la lumină devin relativ instabile.

Aplicaţiile clorului: Clorul ca element pur este un gaz extrem de toxic ce trebuie transportat în cilindrii de oţel. Clorul gazos şi cel lichid se folosesc în dezinfecţia apei de băut, a apei de canalizare şi a apei reziduale din agricultură şi industrie. Apa de băut se clorurează cu o concentraţie de 0,6-1,0 părţi de clor la 1 milion părţi de apă. Acesta eliberează apa de formele vegetative ale bacteriilor fără să afecteze însă semnificativ gustul acesteia.

Hipocloriţii se găsesc dizolvaţi sub formă de săruri de sodiu şi de calciu dizolvate în apă în concentraţie de 70% fiind poate cei mai larg folosiţi dintre compuşii clorului. Se folosesc în igienizarea şi dezinfecţia ustensilelor în lăptării, restaurante şi fabricile de conserve, precum şi la

tratarea bazinelor de înot; izvoarelor de apă minerală, a apei de băut şi chiar a alimentelor proaspete.

Hipocloriţii se mai pot utiliza chiar şi în domenii sanitare conexe la tratarea plăgilor, dezinfecţia aparaturii, lenjeriei şi instrumentarului. Decoloranţii (înălbitorii) obişnuiţi sunt soluţii slabe (5%) de hipoclorit de sodiu care servesc ca dezinfectante, deodorante sau la îndepartarea petelor.

Cloraminele (dicloramina, halozona) sunt folosite mai frecvent ca substituenţi ai clorului pur la tratarea conductelor de dezinfectare a apei. Clorurarea standard a apei poate produce niveluri periculoase de substanţe cancerigene (ex.: trihalometanii) putându-se recurge la adaptarea tratării conductelor de apă cu cloramină. Dacă substanţă este absorbită în sânge în timpul manoperelor de dializă sau la consumatorii de peşte tropical această măsură poate crea probleme prin efectele sale toxice.

Cloraminele servesc, de asemenea, ca agenţi de igienizare sau la dezinfectanţi precum şi în tratarea plăgilor sau a suprafeţelor cutanate.

Iodul şi compuşii sai. Iodul este o substanţă caustică, de culoare neagră, care formează soluţii de culoare cafenie când este dizolvat în apă sau alcool. La scurt timp după descoperirea sa în 1812, a fost rapid adoptat în domeniile medicale ca antiseptic, iar ulterior ca dezinfectant. Principalele preparate pe bază de iod sunt iodul liber în soluţie (I_2) şi iodoforii (de obicei combinaţii ale iodului cu polivinilpiralidonul).

Iodul pătrunde rapid în celulele microbiene, unde se pare că perturbă diverse funcţii metabolice prin împiedicarea legării proteinelor cu hidrogen şi disulfide (ca şi în cazul clorului). Distruge aproape orice fel de microorganisme dacă se foloseşte în concentraţii şi timpi de expunere adecvaţi. Activitatea iodului nu este tot atât de puternic influenţată de substanţele organice şi de pH ca în cazul clorului.

Soluţiile de iod liber există sub trei forme: iodul apos care conţine 2% iod şi 2,4% iodură de sodiu; se utilizează ca antiseptic local înainte de intervenţiile chirurgicale şi uneori ca tratament al infecţiilor cutanate şi al arsurilor. Soluţia concentrată de iod (5% iod şi 10% iodură de potasiu) este utilizată în special ca dezinfectant datorită puterii sale. Este folosit în dezinfecţia obiectelor din material plastic, cauciuc precum şi al lamelor, cateterelor şi termometrelor.

Tinctura de iod este o soluţie de iod 2% în iodură de sodiu şi alcool diluat. Este un germicid cutanat puternic, în special când este necesar un grad înalt de asepsie. Deoarece iodul poate fi extrem de iritant pentru piele şi toxic când este absorbit, soluţiile şi tincturile apoase puternice (57%) nu mai sunt folosite în asepsiile de rutină. Alte dezavantaje constau în caracteristicile de decolorare, corozive şi olfactive (rău mirositoare).

Apa de băut şi apa reziduală pot fi tratate uneori cu compuşi ai iodului însă această procedură este prea costisitoare pentru a putea fi

practicată pe scară largă. Există tablete de iod pentru dezinfectarea apei în caz de urgenţă sau pentru distrugerea agenţilor patogeni din conductele de apă impură.

Iodoforii sunt complexe de iod şi un polimer neutru cum ar fi alcoolul polivinilic. Această combinaţie permite eliberarea lentă a iodului liber mărind gradul de penetraţie. Aceşti compuşi au înlocuit în mare măsură soluţiile de iod liber în antisepsia medicală deoarece sunt coloranţi mai slabi şi mai puţin iritanţi. Produsele iodofore obişnuite conţin 2-10% iod liber şi se folosesc ca antiseptice medicale şi dentare, ca agenţi de degerminare şi ca dezinfectante.

Aplicaţiile constau în pregătirea pielii pentru intervenţii chirurgicale, injecţii, tratarea arsurilor, infecţii vaginale, spălarea mâinilor, a aparaturii, a suprafeţelor şi chiar la prepararea apei de gură.

Fenolul şi derivaţii săi. Fenolul (acidul carbolic) este un compus caustic şi toxic derivat din distilarea gudronului de carbune. Acesta a fost folosit pentru prima dată de Joseph Lister în 1867 ca germicid chirurgical: Fenolul a reprezentat principala substanţă chimică antimicrobiană până când (aproximativ 50 de ani mai tarziu) s-au obţinut alte substanţe fenolice cu efecte mai puţin toxice şi iritante. Soluţiile de fenol nu se mai folosesc astăzi, însă rămân un indicator standard faţă de care se evaluează alte dezinfectante fenolice. Substanţele înrudite chimic cu fenolul sunt deseori denumite substanţe fenolice. Acestea conţin unul sau mai multe inele de carbon aromatic cu grupe funcţionale adăugate.

Cei mai importanţi sunt fenolii alchilaţi (crezoli), fenolii cloruraţi şi bifenolii. În concentraţii mari ei sunt toxici celulari, care rup rapid pereţii şi membranele precipitând proteinele, în timp ce în concentraţii mai slabe inactivează unele sisteme enzimatice importante.

Fenolii sunt substanţe germicide puternice ce distrug formele vegetative ale bacteriilor (inclusiv bacilul tuberculozei), dar nu şi endosporii acestora. Din cauza toxicităţii lor sunt prea periculoşi pentru a putea fi folosiţi ca antiseptice. Pentru obţinerea unui efect maxim fiind slab solubili în apă, multe dintre aceste preparate trebuie amestecate cu săpun.

Hexaclorofenul este un bifenol special cu acţiune puternic germicidă, în special împotriva agenţilor Gram pozitivi din genurile *Staphylococcus* şi *Streptococcus*. Până la descoperirea faptului că acesta se absoarbe prin piele producând tulburări neurologice (1972), acest compus se adăuga la numeroase săpunuri folosite în spitale la spălatul mâinilor înaintea intervenţiilor chirurgicale şi la îmbăieri (nou născuţi) pentru prevenirea infecţiilor stafilococice.

Clorhexidina (Hibitan) este o bază organică complexă ce conţine clor şi două inele fenolice. Mecanismul de acţiune se aseamănă cu cel al

detergenților cationici, datorită faptului că produce denaturarea proteinelor. În funcție de concentrație, poate avea efect bactericid atât pentru Gram pozitivi cât şi pentru Gram negativi, însă este inactiv față de endospori. Prezintă avantaje nete față de alte antiseptice prin faptul că are o acțiune blândă, toxicitate redusă şi efecte rapide. Deşi se leagă de suprafața pielii având un efect antimicrobian rezidual timp de câteva ore, clorhexidina nu este absorbită în țesuturile mai profunde. Soluțiile alcoolice sau apoase de clorhexidină sunt azi folosite în mod curent la spălatul mâinilor, prepararea zonelor cutanate pentru incizii chirurgicale sau injecții.

6.8.2. Influența alcoolilor asupra microorganismelor

Sunt hidrocarburi incolore ce conțin una sau mai multe grupări -OH funcționale. Dintre toți alcoolii existenți, numai etil (2 atomi de carbon) şi izopropil (3 atomi de carbon) sunt adecvați controlului microbian.

Alcoolul metilic (1 carbon) nu este un germicid puternic, iar alcoolii cu lanț mai lung sunt fie greu solubili în apă, fie prea costisitori pentru utilizarea de rutină. Alcoolii sunt folosiți numai în soluții apoase sau ca solvenți pentru alte substanțe chimice antimicrobiene (de exemplu: săruri de mercur, iod). Mecanismul de acțiune al alcoolului depinde de concentrația sa.

Concentrațiile de peste 50% dizolvă lipidele din organe, scad tensiunea superficială a celulelor şi compromit integritatea membranelor. Alcoolul care a pătruns în protoplasmă denaturează proteinele prin coagulare, dar numai în soluții alcoolice apoase de 50-95%. Alcoolul absolut (100%) deshidratează celulele şi inhibă creşterea lor, dar nu produce coagularea proteinelor. Nu acționează asupra sporilor la temperatura camerei, însă poate distruge forme vegetative de bacterii rezistente inclusiv bacilul tuberculozei, cu condiția ca timpul de expunere sa fie adecvat.

Alcoolul etilic (etanolul) este cunoscut pentru caracteristicile sale relativ germicide, neiritante, netoxice cât şi pentru costul său redus. Este activ față de toxina botulinică, dacă este administrat pe cale orală. Alcoolul izopropilic este mai puțin costisitor şi mai germicid decât etanolul, dar aceste avantaje trebuie puse în balanță cu toxicitatea sa.

6.8.3. Influența peroxidului de hidrogen asupra microorganismelor

Apa oxigenată sau peroxidul de hidrogen este un lichid incolor şi caustic care în prezența luminii, metalelor sau a catalazei se descompune

în apă şi oxigen.

Soluțiile de peroxid sunt folosite de aproximativ 50 de ani, dar formulele inițiale erau instabile şi inhibate de substanțele organice. Azi, însă, metodele de fabricare permit sintetizarea unui compus atât de stabil, încât chiar şi în soluțiile diluate îşi menține activitatea de-a lungul mai multor luni de conservare.

Deşi majoritatea celulelor microbiene produc catalază pentru inactivarea cantităților mici de peroxid de hidrogen produse în mod normal în cursul propriului lor metabolism, acestea nu pot neutraliza cantitatea de peroxid de hidrogen, care intră în celulă în cursul dezinfecției şi antisepsiei. Peroxidul de hidrogen are efect bactericid, iar în concentrații mari sporicid. El este util în special în tratamentul infecțiilor cu bacterii anaerobe datorită efectelor letale ale oxigenului asupra acestor forme. Soluțiile de peroxid de hidrogen 6-25% sunt suficient de puternice pentru sterilizarea instalațiilor de împachetat alimente şi chiar a interiorului navelor cosmice. Alți compuşi cu efecte asemănătoare peroxidului de hidrogen sunt: ozonul (O_3), folosit uneori pentru dezinfectarea aerului şi a apei; acidul paracetic, oxidant extrem de puternic folosit pentru sterilizarea stimulatoarelor cardiace şi a camerelor de izolare pentru animale; permanganatul de potasiu ($KMnO_4$) soluție roz deschisă, puternic germicidă, chiar şi atunci când este foarte diluată. Datorită conținutului său extrem de toxic este folosită în special ca algicid.

6.8.4. Influența detergenților asupra microorganismelor

Sunt substanțe organice complexe care, ca grup, sunt adesea denumiți *surfactanți* (surfactans). Ca tipuri chimice, aceştia pot fi de trei categorii: *neionici, anionici* şi *cationici*. Detergenții neionici (neîncărcați) au o putere germicidă limitată. Din acest grup fac parte săpunurile.

Detergenții cationici (în special compuşii cuaternari de amoniu) sunt cei mai eficienți dintre cele trei grupe.

Toți detergenții au o structură moleculară generală care include un reziduu de hidrocarbură cu catenă lungă şi un grup polar.

Datorită acestei configurații detergenții acționează prin diminuarea tensiunii celulare superficiale. Acesta poate avea mai multe efecte printre care ruperea membranei celulare şi pierderea permeabilității selective.

Compuşii cuaternari de amoniu provoacă distrugerea protoplasmei bacteriene, precipitarea proteinelor sau inhibă metabolismul acestora.

Datorită capacității lor de a interacționa cu suprafețele sunt eficienți ca agenți de umectare de curățire sau emulgatori.

Gama activității detergenților este largă. Dacă sunt folosiți în concentrații medii, compuşii cuaternari de amoniu sunt eficienți împotriva

bacteriilor Gram pozitive, fiind însă ineficienți în cazul bacililor tuberculozei, pseudomonadelor şi sporilor.

Compuşii cuaternari de amoniu includ clorura de benzalcaniu, şi clorura de cetilpiridiniu. În diluții variind de la 1:100 la 1:1000 sunt amestecați cu agenți de curățire pentru ca în acelaşi timp să dezinfecteze şi să curețe suprafețele sau aparatura din clinici ori spitale. Datorită proprietăților lor detergente şi a toxicității reduse, compuşii cuaternari de amoniu se situează printre cei mai buni agenți igienizanți.

6.8.5. Influența săpunurilor asupra microorganismelor

Sunt compuşi alcalini obținuți prin combinarea acizilor graşi din uleiuri (ulei de nucă, de cacao, de ricin, din semințe de bumbac, de in) cu săruri de sodiu sau potasiu. În practica curentă săpunurile sunt germicide slabe, distrugând numai forme foarte sensibile de bacterii (gonococi, meningococi, spirochete; unele specii de *Pseudomonas* se pot dezvolta abundent în spitale, chiar şi în savoniere).

Săpunurile sunt folosite mai ales în gospodărie, ajutând la îndepărtarea unor grăsimi şi alte reziduuri care conțin microorganisme.

Ele dobândesc o valoare mai mare dacă sunt amestecate cu alcool (numit săpun verde), clorhexidină sau iod, putând fi folosite cu succes în clinici şi spitale.

6.8.6. Influența compuşilor metalelor grele asupra microorganismelor

Diferite forme ale elementelor metalice (mercur, argint, aur, cupru, arsen, zinc) au fost utilizate în decurs de mai multe secole în controlul microbian. Ele sunt deseori denumite metale grele datorită greutății lor atomice relativ mari. Metalele care au o greutate moleculară mai mare (mercur, argint, aur) nu exercită o funcție celulară benefică fiind, de fapt, toxice chiar şi în concentrații infime (părți per milion). Această proprietate de a exercita efecte antimicrobiene în cantități extrem de mici, se numeşte *acțiune oligodinamică*.

Metalele grele germicide conțin o sare metalică de natură organică sau anorganică şi există sub formă de soluții apoase, tincturi, unguente sau săpunuri.

Mercurul, argintul şi majoritatea celorlalte metale exercită efecte germicide prin formarea unor ioni, care alcătuiesc complexe cu mai multe grupe funcționale, inclusiv grupele sulfhidril, oxidril, amine şi fosfați. Inactivarea proteinelor produce rapid oprirea metabolismului şi a creşterii. Pot distruge rapid multe tipuri de microbi inclusiv forme vegetative de bacterii, dar nu şi endospori.

Din păcate, utilizarea metalelor în controlul microbian prezintă mai multe dezavantaje:

- sunt foarte toxice dacă sunt ingerate, inhalate sau absorbite prin piele, fie chiar şi în cantităţi infime;
- provoacă de obicei reacţii alergice;
- cantităţile mari de lichide biologice şi deşeuri neutralizează sau diminuează acţiunile lor;
- microbii pot deveni în timp rezistenţi la acţiunea metalelor.

Tincturile organice de mercur (0,001-1,2%) cu turnesol (Mertiolat) şi nitromersol (Metafen) sunt antiseptice destul de eficiente şi previn infecţiile, dar nu trebuiesc aplicate pe o piele fisurată, deoarece în acest caz, devin nocive şi pot întârzia vindecarea.

Mercurocromul, în trecut produs de bază în cabinetele medicale, este azi considerat unul dintre cele mai slabe antiseptice.

Un compus al argintului, care rămâne în continuare în uz curent este nitratul de argint ($AgNO_3$). A fost introdus la sfârşitul secolului al XIX-lea de către Crede pentru prevenirea unor infecţii bacteriene (de exemplu: infecţiile gonococice). La noii născuţi, tehnica lui Crede consta în instilarea unei picături dintr-o soluţie 1% în ochi pe suprafaţa conjunctivală pentru un interval scurt de timp, urmată de clătirea cu ser fiziologic pentru reducerea iritaţiei. Acest preparat nu se mai foloseşte astăzi în tratamentul noilor născuţi deoarece s-a demonstrat că unii agenţi infecţioşi, cum ar fi chlamidiile, sunt rezistenţi la nitratul de argint. Soluţiile pe bază de nitrat de argint se folosesc în prezent ca germicid local şi dezinfectant al suprafeţelor dentare. Un compus al argintului când este adăugat în pansamente, cum ar fi de exemplu unguentul cu sulfadiazină, previne eficient infecţia cu bacterii în arsurile de gradul 2 şi 3.

Preparatele de argint coloidal conţin săruri de argint în complex cu proteine. Deoarece eliberează progresiv ionii de argint, sunt mult mai blânde şi mai puţin toxice decât sărurile anorganice.

6.8.7. Influenţa aldehidelor asupra microorganismelor

Substanţele organice care conţin gruparea funcţională CHO (grupare puternic reducătoare) pe carbonul terminal, se numesc aldehide. Substanţele obişnuite, ca zaharurile şi unele grăsimi sunt din punct de vedere tehnic aldehide. Dintre acestea, cel mai frecvent folosite sunt *glutaraldehida* şi *formaldehida (aldehida formică)*.

Glutaraldehida este un lichid galben acid, cu miros slab. Cele două grupe aldehidice ale moleculei favorizează formarea de polimeri. Mecanismul de acţiune asupra microbilor nu este încă pe deplin elucidat. S-ar părea că, acestea leagă transversal moleculele proteice de pe suprafaţa

celulei prin alchilarea aminoacizilor, un proces în care un atom de hidrogen de pe un aminoacid este înlocuit de însăşi glutaraldehidă.

Ea poate, de asemenea, să perturbe ireversibil activitatea enzimelor în interiorul celulei. Are un spectru larg şi acționează rapid, fiind una dintre puținele substanțe chimice acceptată oficial ca sterilizant şi dezinfectant de nivel înalt. Distruge în trei ore endosporii şi în câteva minute formele vegetative (chiar şi bacilii tuberculozei sau pseudomonadele). Glutaraldehidele, mai prezintă şi alte avantaje cum ar fi:

- puterea lor se menține chiar şi în prezența unei materii organice;
- sunt necorozive; nu deteriorează materialele plastice;
- sunt mai puțin toxice şi iritante decât formaldehidele.

Principalul lor dezavantaj, constă în faptul că sunt întrucâtva instabile, în special la un pH şi o temperatură crescută.

Formaldehida este un gaz iritant pătrunzător care se dizolvă rapid în apă şi formează o soluție apoasă numită formol. Saturația completă a formaldehidei (37%) produce o soluție de formol 100%. Substanța chimică devine germicidă în urma legării sale cu acizii nucleici şi grupele funcționale de aminoacizi. Formolul este un dezinfectant de nivel mediu spre înalt, deşi acționează mai lent decât glutaraldehida. Toxicitatea extremă a formolului (intră în clasificarea substanțelor cancerigene), cât şi efectele sale iritante asupra pielii şi mucoaselor limitează în mare măsură utilizarea sa clinică.

Glutaraldehida, a fost introdusă în sterilizarea chimică a materialelor care se deteriorează prin căldură, în 1963, ca un substitut al formolului. Se foloseşte în sterilizarea aparaturii şi în dezinfecția practică a instrumentelor, atunci când sterilizarea prin căldură nu este posibilă. Este un dezinfectant alternativ eficient, însă costisitor, folosit în medicină şi industrie. Glutaraldehida poate fi utilizată şi în alte scopuri cum ar fi: conservarea vaccinurilor, igienizarea carcaselor de pui etc.

Formolul poate fi diluat în alcool (8%) sau în apă (2-8%) având diverse aplicații. Tinctura de formol are o utilizare limitată, ca dezinfectant al instrumentelor chirurgicale. Pentru îndepărtarea reziduurilor de formol, orice obiect care vine în contact direct cu pielea trebuie clătit minuțios cu apă sterilă.

6.8.8. Influența coloranților anilinici asupra microorganismelor

Sunt foarte activi față de endosporii bacteriilor Gram pozitive. Coloranții galbeni de acridină, acriflavină, şi proflavină sunt uneori utilizați ca antiseptice cât şi pentru tratamentul plăgilor în clinicile umane şi veterinare. Cu toate acestea, aplicațiile coloranților sunt limitate datorită

efectului lor colorant precum şi spectrului îngust de activitate.

6.8.9. Influența acizilor organici asupra microorganismelor

Sunt larg folosiți în conservarea alimentelor, deoarece previn germinarea endosporilor şi multiplicarea bacteriilor.

Acidul acetic (sub formă de oțet) se foloseşte ca dezinfectant în laboratoarele de leptospiroză, fiind de asemenea folosit şi în gospodării la murarea alimentelor.

Acidul lactic se adaugă la varza acră şi măsline pentru a preveni alterarea cu bacterii anaerobe (în special cele din genul *Clostridium*), iar acidul benzoic şi acidul sorbic se adaugă la băuturi, siropuri şi margarină.

6.8.10. Influența unor decontaminanți gazoşi asupra microorganismelor

Gazele cel mai larg utilizate în activitatea practică, sunt *oxidul de etilenă (ETO), oxidul de propilenă şi betapropiolactona (BPL).*

Oxidul de etilenă este o substanță incoloră care există sub formă gazoasă la temperaturi normale. Este extrem de exploziv în aer, caracteristică ce poate fi eliminată cu un procent mare de dioxid de carbon sau fluorocrom. Este un agent alchilant foarte puternic şi reacționează riguros cu moleculele de guanină ale ADN-ului şi cu grupele funționale de proteine. Prin aceste mecanisme el blochează atât replicarea ADN-ului cât şi acțiunile enzimatice.

Oxidul de etilenă este unicul gaz, în general acceptat, pentru sterilizarea chimică, deoarece când este folosit conform unor proceduri riguroase devine un bun biocid.

Un aparat de sterilizare special proiectat pentru ETO numit *chimioclav* (o variantă a autoclavului) este prevăzut cu o cameră cu orificii pentru gaze şi cu dispozitive de reglare a temperaturii, presiunii şi umidității. ETO are un efect penetrant, dar acționează lent. În funcție de temperatură şi de amestecul de gaze folosit pentru sterilizare sunt necesare de la 90 de minute la 3 ore. Unele obiecte absorb reziduurile de ETO şi de aceea trebuie aerisite câteva ore, după expunere, pentru a se asigura îndepărtarea unei cantități cât mai mari de gaz rezidual. Din cauza caracterului său exploziv manipularea sa este periculoasă, iar în cazul unui contact direct, ETO poate leza plămânii, ochii şi mucoasele fiind trecut în rândul substanțelor carcinogene.

În trecut ETO era folosit la tratarea medicamentelor şi alimentelor, fiind chiar luat în considerare ca mijloc posibil de sterilizare a sângelui, serului şi a mediilor de cultură. În prezent este utilizat în special la

sterilizarea şi dezinfectarea materialelor plastice şi a instrumentelor delicate din spitale şi industrie. În concentrație de 450-800 mg/l, ETO poate steriliza instrumente chirurgicale, plăci Petri, seringi, stimulatoare cardiace preambalate etc.

Este folosit, de asemenea, în continuare la sterilizarea condimentelor şi alimentelor uscate.

Oxidul de propilenă este îndeaproape înrudit cu ETO, deoarece are proprietăți fizice şi un mecanism de acțiune similar cu acesta, fiind însă mai puțin toxic.

Se foloseşte pentru sterilizarea alimentelor (pulberi, amidon, condimente, nuci) şi ca dezinfectant.

Betapropiolactonă (BPL) este un lichid neexploziv care, de asemenea, alchilează ADN-ul. Deşi este mai germicid decât oxizii, nu este tot atât de penetrant. Aceste caracteristici precum şi toxicitatea sa înaltă îi limitează utilizarea folosindu-se la dezinfecția clădirilor, camerelor sterile, instrumentelor etc.

6.9. Influența altor organisme asupra bacteriilor

În majoritatea cazurilor (cu mici excepții) între bacterii şi alte forme de viață se creează interrelații complexe şi interesante. Aceste relații pot să apară între microbi sau pot implica organisme complexe, ca animale sau plante. Pot avea efecte benefice, neutre sau nocive asupra organismelor implicate.

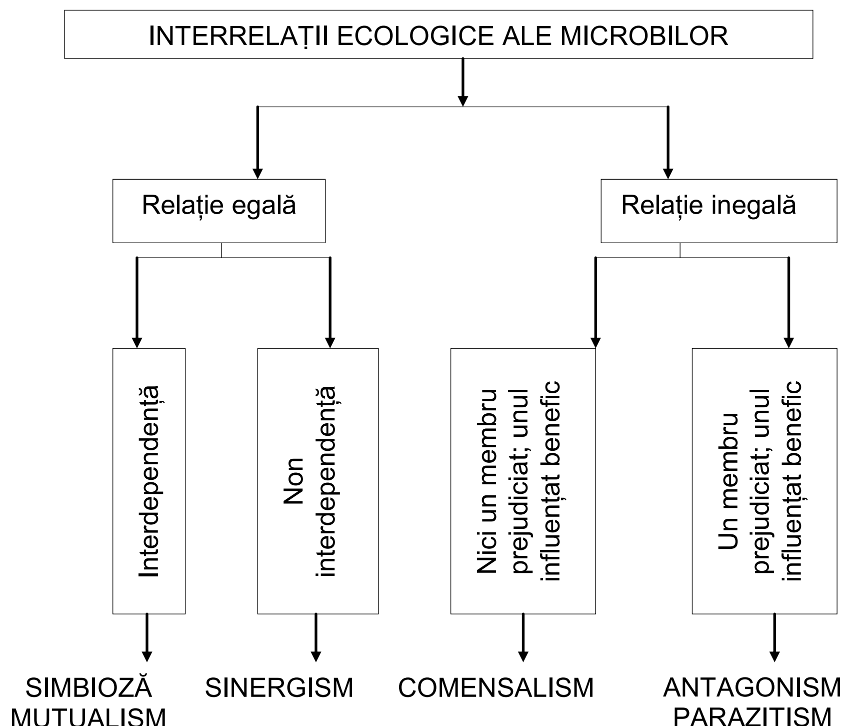
Când două microorganisme trăiesc într-un parteneriat foarte strâns, ele au o relație de simbioză şi se numesc *simbioți*. Deşi, inițial simbioza era înțeleasă ca o simplă coabitare a unor organisme, acest termen este uneori folosit în sensul unei relații obligatoriu reciproc benefice, cunoscută şi sub denumirea de *mutualism*.

O relație simbiotică implică deseori o interacțiune a două organisme care împart în comun un habitat sau care fac schimb de substanțe nutritive. De exemplu, protozoarele conțin deseori în citoplasma lor bacterii simbiotice. Nu se cunosc prea multe lucruri în legătură cu contribuția acestor simbioți, dar este posibil ca protozoarele să le ofere bacteriilor factori de creştere, iar acestea din urmă să constituie la rândul lor habitate pentru protozoare.

Un protozoar se deplasează fixând bacterii simbiotice în membrana celulară, care acționează ca nişte „vâsle". Acest tip de relație este izbitor, în special în cazul simbiozei multiple a termitelor, care adăpostesc protozoare endosimbiotice, astfel încât lemnul mâncat de termite, este prelucrat de microbi şi toate cele trei organisme reuşesc foarte bine să realizeze acest lucru.

Diagrama de mai jos, oferă o privire de ansamblu asupra principalelor tipuri de interrelații microbiene:

Schema 6.1.



Microorganismele au relații simbiotice cu animale foarte diverse ca: bureți, viermi şi mamifere.

Bacteriile şi protozoarele sunt esențiale în activitatea rumenului erbivorelor. Astfel, acestea au capacitatea de a degrada compuşi inaccesibili enzimelor digestive, cum ar fi celuloza şi alte glucide din furaje, transformându-le în compuşi energetici absorbabili.

Substanțele complexe din hrană sunt digerate în mai multe stadii, în cursul cărora animalul regurgitează şi mestecă vegetalele parțial digerate, iar uneori eructează metanul produs de simbionții microbieni.

De asemenea, bacteriile florei ruminale sintetizează şi majoritatea vitaminelor de grup B.

Între bacterii şi plante se pot realiza astfel de relații. De exemplu, la leguminoase, care prezintă la nivelul rădăcinilor nodozități în care se dezvoltă bacterii din genul *Rhizobium*, ce fixează azotul atmosferic.

O altă relație de simbioză interesantă este aceea care se desfăşoară în

craterele vulcanice termale profunde de pe fundul mărilor, unde forțele geologice dispersează plăcile crustei terestre, eliberând căldură şi gaze. Aceste cratere reprezintă un focar de activitate biologică şi geologică tumultoasă.

Descoperirile făcute pentru prima dată la sfârşitul anilor şaptezeci au demonstrat că baza lanțului energetic din această colectivitate nu este soarele, deoarece craterele sunt prea adânci pentru ca lumina solară să poată pătrunde la acest nivel (2600 metri). În schimb, acest ecosistem se bazează pe populația bacteriană autotrofă masivă, care oxidează cantitatea abundentă de hidrogen sulfurat eliberată prin activitatea vulcanică.

Sinergismul reprezintă o relație de cooperare între două organisme, benefică ambilor membrii, dar nu în mod obligatoriu. Este un fel de mezalianță între două organisme pentru a realiza un factor util metabolismului lor, pe care nici unul dintre cei doi nu ar putea să-l realizeze singur. Uneori relația este nutrițională (ca în hrănirea încrucişată), iar produsele metabolice stimulează creşterea ambilor membri. Un exemplu de sinergism îl reprezintă relația dintre plante şi bacteriile din sol sau dintre unele bacterii care îşi stimulează reciproc creşterea. Astfel, arginina este descompusă până la stadiul de putresceină prin acțiunea sinergică a bacteriilor *Escherichia coli* şi *Streptococcus faecalis*. Există de asemenea cazuri când două tulpini apigmentogene de *Serratia marcescens,* dacă sunt cultivate împreună au posibilitatea să stimuleze pigmentul *prodigiozină*, produs în mod normal numai de tulpinile pigmentogene.

În infecțiile sinergice, asocierea unor organisme (uneori chiar până la zece specii) poate provoca o lezare tisulară pe care separat nici una dintre speciile respective nu o pot iniția. De exemplu, gangrenele gazoase şi infecțiile gingivale au o etiologie multifactorială. Pododermatita infecțioasă a bovinelor şi ovinelor este determinată de asocierea a trei bacterii, care se implică una pe cealaltă în declanşarea procesului patologic. Multe interrelații implică un dezechilibru între contribuțiile participanților.

În comensalism, între doi membri notați cu A şi B se creează o astfel de relație, încât A nu este nici prejudiciat, nici avantajat de B, însă acesta din urmă beneficiază de prezența lui A. În această situație rezultă că B este comensalul lui A. Un exemplu clasic de comensalism, îl reprezintă *satelitismul*, fenomen bazat pe factori nutriționali sau protectori.

În satelitismul nutrițional, microbul A oferă un factor de creştere necesar microbului B. Într-o altă formă microbul A distruge o substanță toxică sau inhibitoare pentru B. De exemplu, coloniile de *Haemophilus* se dezvoltă cu precădere limitrof coloniilor doicii. Doici bune sunt stafilococii albi sau unele specii de *Bacillus*; „doica” este cea care sintetizează factorul V prin cultivarea ei pe acelaşi mediu cu specia ce

necesită acest factor (în cazul de față cu *Haemophilus*), datorită concentrației mari de factor V din această zonă.

Un alt tip de comensalism se poate realiza între diverse bacterii, unele specii procurând substratul necesar celorlalte. De exemplu, pe acest tip de relație se bazează circulația principalelor elemente biogene în natură (azot, carbon, sulf).

O relație interesantă, de acest gen, este aceea în care beneficiul rezultă din degradarea sau neutralizarea unei substanțe cu efect nociv pentru partener. De exemplu, *Escherichia coli* produce penicilinaza, enzimă care degradează penicilina, creând astfel condiții de multiplicare bacteriilor penicilinosensibile. Un alt exemplu îl constituie unele tulpini de *Pseudomonas* care produc N-heptil-4-hidroxichinolein-N-oxid, care este o substanță ce împiedică efectul antibacterian al streptomicinei.

Conceptul de parazitism reprezintă un tip de relație în care microbul A se multiplică pe baza unui alt microb B într-o relație parazit-gazdă (A-B). De exemplu, bacteriofagii sunt virusurile bacteriene ce parazitează celula vegetativă. O dată cu multiplicarea acestora are loc ruperea celulei gazdă, fenomen ce se manifestă pe mediile solide prin formarea de plaje (zone circulare de liză).

Acest fenomen a fost valorificat în scopul identificării bacteriilor prin testul fagic (de exemplu la: *Salmonella, Brucella abortus*, *Bacillus anthracis*), precum şi la crearea în cadrul unor specii a unor diviziuni (fagovar, fagotip, lizotip). În laborator această metodă este folosită în tratamentul unor infecții, cum ar fi cele produse de enterobacteriaceae şi poartă denumirea de fagoterapie.

Parazitismul unei bacterii față de altă bacterie se datorează speciei *Bdellovibrio bacteriovorus*. Aceasta este capabilă să paraziteze bacterii cum ar fi cele din genurile *Escherichia, Salmonella, Serratia, Proteus, Pseudomonas, Streptococcus*.

O altă asociere nocivă o formează *antagonismul* care apare atunci când membrii unei colectivități A şi B sunt în competiție.

În această interacțiune inegală microbul A secretă substanțe chimice care inhibă sau omoară microbul B din acelaşi habitat.

Acest tip de relație conferă primului venit (microbul A) un avantaj competitiv. Se datorează mai ales diferențelor de viteză de multiplicare, manifestându-se atât în cadrul aceleaşi specii cât şi între specii diferite. În acest proces mai intervin şi alți factori cum ar fi compoziția mediului sau gradul de mobilitate al bacteriilor. De exemplu, bacteriile ce aparțin genului *Proteus* posedă un aparat flagelar extrem de activ, formând o cultură în pânză (gazon) şi inhibând totodată dezvoltarea altor bacterii. Competiția intraspecifică se întâlneşte între tulpini cu însuşiri biologice diferite, cum ar fi cea dintre tulpinile patogene şi cele nepatogene.

Interacțiunile de acest tip se petrec de obicei în sol unde colectivități mixte de microbi se găsesc deseori în competiție pentru spațiu şi hrană. Exemplele cele mai ilustrative sunt cele din antibioze (producerea de antibiotice) precum şi producerea de bacteriocine. Tendința naturală a microorganismelor de a produce antibiotice a fost valorificată cu succes în controlul şi tratamentul infecțiilor. Primul antibiotic a fost descoperit de către Alexander Fleming în 1929, datorită competiției exercitate de o ciupercă din genul *Penicillium* față de un stafilococ. În 1940, Chain şi Florey au reuşit să extragă din această ciupercă penicilina în stare pură, revoluționând practica medicală.

Cele mai multe dintre antibiotice se obțin din bacterii ce aparțin genului *Streptomyces* (streptomicina, cloramfenicolul, tetraciclina, eritromicina etc.) sau *Bacillus* (polimixina, bacitracina).

În majoritatea cazurilor antibioticele au un efect bacteriostatic şi acționează selectiv asupra celulelor bacteriene. Bacteriocinele sunt proteine produse de bacteriile Gram negative, inhibitoare pentru alte bacterii aflate în competiție cu acestea. Au fost descoperite de către André Gratia, în 1925 la *Escherichia coli*.

Mai târziu s-au identificat substanțe asemănătoare şi la alte specii bacteriene, creându-se termenul mai general de bacteriocine. Capacitatea de a produce bacteriocine poartă denumirea de bacteriocinogenie, fiind deseori corelată cu patogenitatea bacteriilor. Bacteriocinele reprezintă o categorie aparte de antibiotice, cu spectru îngust de activitate, efect bactericid şi un mecanism de acțiune diferit față de cel al antibioticelor tipice.

Organismul animal constituie un habitat bogat pentru bacterii. Microbii, care în mod normal se găsesc pe piele, tractul gastrointestinal sau în alte sedii, poartă denumirea de *floră normală*. Aceasta participă la relațiile simbiotice sinergice, comensale şi parazitare cu organismele gazdă. De exemplu, anumite bacterii comensale din intestin produc unele vitamine.

Unele specii ajută la menținerea unui mediu ce protejează organismul de infecțiile produse de alți microbi. De exemplu, *Lactobacillus*, care protejează vaginul este comensal, dar se poate transforma în agent patogen în anumite condiții, invadând țesuturile corpului şi producând o infecție.

Sute de specii bacteriene comensale îşi duc traiul în sau pe suprafața organismelor animale, fie în scop prejudiciativ fie protectiv. Să considerăm, de exemplu, pe *Staphylococcus epidermidis* ce trăieşte în regiunile moarte ale pielii, sau microbii orali care îşi procură hrana din fluxul constant de nutrienți din cavitatea bucală, ori miliardele de bacterii care populează intestinul gros. Deoarece flora normală a organismului se află într-o continuă schimbare, aceste relații nu sunt absolute, iar un simbiot sau un

comensal se poate transforma într-un agent patogen.

Infecția bacteriană constituie un tip de relație antagonică între bacterii şi organismele animale.

Patogenitatea, este o însuşire a unui microb de a produce un efect nociv asupra organismului gazdă. Numărul speciilor patogene nu depăşeşte 10% din totalul speciilor bacteriene cunoscute.

Bacteriile patogene se împart în bacterii parazite obligatoriu, cu grad ridicat de patogenitate şi care nu pot supraviețui un timp îndelungat în afara organismului gazdă; bacterii comensale potențial sau condiționat patogene, care fac parte din flora autohtonă a organismului şi care nu-şi exprimă patogenitatea decât în anumite condiții; bacterii saprofite, accidental patogene, prezente în mediile naturale.

Principalele însuşiri care asigură patogenitatea bacteriilor sunt: *virulența,* care reprezintă capacitatea unei bacterii de a se multiplica în organism la nivelul țesuturilor; *infecțiozitatea,* capacitatea acestora de a pătrunde în organism şi de a se multiplica în diferite țesuturi şi organe; *invazivitatea,* capacitatea de a difuza în diverse compartimente ale organismului, *agresivitatea,* capacitatea unei bacterii de a neutraliza sau anihila prin unele elemente structurale (de exemplu, capsula bacteriană) sau secreții (de exemplu, stafilocoagulaza) diverse mecanisme de apărare a organismului (fagocitoză); *toxicitatea,* proprietatea unei bacterii de a exercita un efect alternativ sau dereglator prin intermediul endo şi exotoxinelor.

În funcție de țesutul sau organismul asupra căruia acționează se cunosc foarte multe feluri de toxine.

Tabel 6.4

Caracterele diferențiale dintre exo şi endotoxine

(adaptare după H. Răducănescu şi Bica Popii)

Caracterul diferențial	Exotoxine	Endotoxine
Compoziția chimică	Proteine	Lipopoliglucide
Sensibilitatea la 60 de grade Celsius	Sensibile	Destul de rezistente
Categoriile de bacterii producătoare	Gram pozitive	Gram negative
Localizarea toxinelor în raport cu celula	Se elimină în mediu	Rămân cantonate în celulă
Gradul de toxicitate	Specific şi puternic	Nespecific şi slab
Imunogenitate	Puternică	Slabă

Organismul gazdă se opune mecanismelor de patogenitate ale bacteriilor prin factori genetici, fiziologici şi imunologici specifici.

6.10. Influența parametrilor intrinseci şi extrinseci ai alimentelor asupra microorganismelor

Plantele şi animalele care se constituie în sursă de hrană pentru oameni prezintă mecanisme evoluate de apărare împotriva invaziei şi proliferării microorganismelor, iar unele dintre acestea rămân active în alimentele proaspete. Prin apelarea la aceste mecanisme naturale de apărare se poate limita sau stopa dezvoltarea microorganismelor patogene sau de alterare, fără a deprecia calitatea alimentelor ca materie primă sau produsele derivate din ele.

6.10.1. Influența parametrilor intrinseci ai alimentelor asupra microorganismelor

Parametrii țesuturilor animale şi vegetale sunt denumiți parametrii intrinseci. Aceştia sunt următorii:

1. pH-ul şi puterea de tamponare a alimentului;
2. umiditatea produselor alimentare (valoarea a_w);
3. compoziția chimică a alimentului;
4. potențialul oxidoreducător şi capacitatea de echilibrare;
5. conținutul în nutrienți;
6. constituenții antimicrobieni naturali;
7. structura biologică.

6.10.1.1. Influența pH-ul alimentului asupra microorganismelor

Majoritatea microorganismelor cresc cel mai bine la valori ale pH-ului de aproximativ 7,0 (6,6-7,5), în timp ce foarte puține dintre ele cresc la valori sub 4,0. Totuşi, microorganismele se pot dezvolta în limite largi de pH (între 1,5-11).

Bacteriile patogene tind să fie mai dificile în relațiile lor cu pH-ul, decât mucegaiurile şi levurile. În ceea ce privesc maximele şi minimele de pH ale microorganismelor, acestea nu pot fi considerate ca limite precise, deoarece se ştie că valorile reale depind de alți parametrii de creştere. De exemplu, minimele de pH ale anumitor lactobacili s-au dovedit a fi dependente de tipul de acid folosit: acizii citric, clorhidric, fosforic şi tartaric permițând o creştere la o valoare de pH mai redusă decât acidul acetic sau lactic. *Alcaligenes faecali* are o creştere în limite mai largi ale pH-ului în prezența NaCl 0,2M decât în absența acestuia sau în prezența citratului de sodiu 0,2M.

Tabel 6.5.

Sensibilitatea la pH a unor microorganisme

pH

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Mucegaiuri

Drojdii

Alicyclobacillus spp

Salmonella spp.

Acetobarter spp.

Lysteria monocytogenes

Yersinia enterocolitica

Escherichia coli

Clostridium botulinum

Bacillus cereus

Campylobacter spp.

Shigella spp

Vibrio parahaemolyticus

Vibrio cholerae

Clostridium perfringens

După cum se observă şi în tabelul de mai sus, limitele de pH pentru *Listeria monocytogenes* şi *Staphylococcus aureus* sunt similare.

Dintre alimentele prezentate în tabelul 6.6 se poate observa că fructele, băuturile nealcolice, oțeturile şi vinurile se situează sub limita la care cresc, în mod normal, bacteriile. Calitatea excelentă de păstrare a acestor produse se datorează în mare parte pH-ului. O observație obişnuită este aceea că fructele suferă în general o alterare prin mucegaiuri şi levuri, iar acest lucru se datorează capacității microorganismelor de a creşte la valori de pH < 3,5 adică la o valoare considerabil mai scăzută decât minima majorității bacteriilor care alterează sau otrăvesc alimentele. Majoritatea produselor din carne şi a alimentelor marine au un pH final mai mare sau egal cu 5,6. Din această cauză, aceste produse sunt alterate de acțiunea bacteriilor, mucegaiuri şi levuri.

Majoritatea legumelor au valori de pH mai reduse decât fructele şi, în consecință, legumele pot fi supuse în mai mare măsură alterării bacteriene, decât celei fungice.

Carnea provenită de la animalele obosite se alterează mai rapid decât cea provenită de la animalele odihnite, acest lucru este o consecință directă a pH-ului final atins în momentul producerii rigidității cadaverice (rigor mortis). După moartea unui animal bine odihnit glicogenul este de obicei transferat în acid lactic, ceea ce provoacă direct o scădere a valorilor de pH de la 7,4 la 5,6, în funcție de tipul de animal. Callow a observat că valorile de pH cele mai reduse pentru carnea de vită atinse în momentul rigidității cadaverice sunt de aproximativ 5,6.

Tabel 6.6.

Valorile aproximative ale pH-ului la unele produse alimentare

Aliment	pH	Aliment	pH
Legume		**Produse de origine animală**	
Asparagus (muguri şi tulpini)	5,7-6,1	Unt	6,1-6,4
Fasole	4,6-6,5	Babeurre	4,5
Sfeclă de zahăr	4,2-4,4	Lapte	6,3-6,5
Broccoli	6,5	Smântână	6,5
Varză verde	5,4-6,0	Brânză Cheddar	5,9
Morcovi	4,9-5,2; 6,0	Carne tocată de vită	5,1-6,2
Conopidă	5,6	Jambon	5,9-6,1
Țelină	5,7-6,0	Carne	6,0
Porumb dulce	7,3	Pasăre	6,2-6,4
Castraveți	3,8	Peste (majoritatea speciilor imediat după moarte)	6,6-6,8
Vânătă	4,5	Scoici	6,5
Lăptuci	6,0	Crabi	7,0
Măzline	3,6-3,8	Stridii	4,8-6,3
Ceapă roşie	5,3-5,8	Creveți	6,8-7,0
Pătrunjel	5,7-6,0	Ton	5,2-6,1
Păstârnac	5,3	Somon	6,1-6,3
Cartofi	5,3-5,6		
Dovleac	4,8-5,2		
Spanac	5,5-6,0		
Tomate	4,2-4,3		
Napi	5,2-5,5		
Fructe		Suc de portocale	3.6-4.3
Mere	2.9-3.3	Prune	2.8-4.6
Cidru de mere	3.6-3.8	Pepene roşu	5.2-5.6
Suc de mere	3.3-4.1	Suc de grefe	3.0
Banane	4.5-4.7	Struguri	3.4-4.5
Smochine	4.6	Lamâi	1.8-2.0
Pepene galben	6.3-6.7		

Tabel 6.7.

Valorile aproximative ale pH-ului la unele microorganisme

Microorganism	pH	Microorganism	pH
Aeromonas hydrophila	cca. 6,0	*Listeria monocytogenes*	4,1
Alicyclobacillus acidocaldarius	2,0	*Penicillium roqueforti*	3,0
Bacillus cereus	4,9	*Plesiomonas shigelloides*	4,5
Botrytis cinerea	2,0	*Pseudomonas fragi*	cca. 5,0
Clostridium botulinum, Group I	4,6	*Salmonella* spp.	4,05
C. *botulinum,* Group Il	5,0	*Shewanella putrefaciens*	cca. 5,4
C. *perfringens*	5,0	*Shigella flexneri*	cca. 5,5
Escherichia coli 0157:H7	4,5	S. *sonnei*	5,0
Gluconobacter spp.	3,6	*Staphylococcus aureus*	4,0
Lactobacillus brevis	3,16	*Vibrio parahaemolyticus*	4,8
L. plantarum	3,34	*Yersinia enterocolitica*	4,18
Lactococcus lactis	4,3	*Zygosaccharomyces bailii*	1,8

Pentru carnea de miel şi de porc valorile de pH minime şi maxime găsite de către Callow au fost 5,4 şi 6,7 şi respectiv 5,3 şi 6,9. Briskey a raportat că pH-ul ultim al cărnii de porc poate scădea, în anumite condiții, până la aproximativ 5,0. Efectul pH-ului asupra microorganismelor la aceste valori, în special asupra bacteriilor este evident. În ceea ce priveşte carnea de peşte, se ştie că peştii halibut (din care se face untura de peşte, bogată în vitaminele A şi E) a căror carne atinge un pH final de 5,6 prezintă calități mai bune de păstrare decât carnea majorității celorlalți peşti, a căror valoare de pH se situează între 6,2 şi 6,6.

Unele alimente se caracterizează printr-o aciditate inerentă; altele însă, îşi datorează aciditatea sau pH-ul acțiunii anumitor microorganisme, aşa cum este cazul laptelui fermentat, verzei acre şi murăturilor. Indiferent de sursa de aciditate, efectul asupra calității păstrării apare ca fiind acelaşi.

Unele alimente rezistă mai bine modificărilor de pH decât altele. Cele care tind să reziste acestor modificări se numesc *tamponate*. În general, produsele din carne sunt mai bine tamponate decât legumele. La capacitatea de tamponare a produselor de carne contribuie diferitele lor proteine. Legumele au în general un conținut redus de proteine şi, ca urmare, capacitatea de tamponare pentru a rezista modificărilor de pH, în timpul creşterii microorganismelor este absentă.

Aciditatea naturală sau inerentă a alimentelor, în special a fructelor este posibil să fi evoluat ca o modalitate de protecție a țesuturilor împotriva distrugerii de către microorganisme. Fructele ar trebui să aibă valori de pH sub cele necesare multor microorganisme implicate în alterarea alimentelor. Funcția biologică a fructului este protejarea componentei reproductive a plantei: semințele, iar acest fapt a fost important în procesul evolutiv al plantelor cu fructe.

Deşi valorile acide de pH sunt mai utile în inhibarea microorganismelor, valorile alcaline (12-13) sunt cunoscute ca fiind distructive, cel puțin pentru unele bacterii. De exemplu, utilizarea de $Ca(OH)_2$ pentru producerea valorilor de pH în aceste limite s-a dovedit distructivă pentru *Listeria monocytogenes* şi alți agenți patogeni din alimentele proaspete.

Efectele pH-ului. Un pH advers afectează cel puțin două aspecte ale respirației celulelor microbiene: funcția enzimelor şi transportul nutrienților în interiorul celulei. Membrana citoplasmatică a microorganismelor este relativ impermeabilă la ioni H^+ şi OH^-. De aceea, concentrația lor în citoplasmă rămâne constantă în ciuda variațiilor mari, ce se pot produce în pH-ul mediului înconjurător. Conway and Downey au observat că pH-ul intracelular al celulelor levurice din drojdia de pâine este de 5,8. Deşi, în cursul fermentării glucozei regiunea externă a celulelor este mai acidă iar regiunea internă este mai alcalină. Pe de altă

parte, Peno şi alţii, nu au susţinut afirmaţia că pH-ul celulelor levurice rămâne constant în timpul variaţiilor de pH ale mediului. La majoritatea celulelor s-a constatat că pH-ul intern este aproape neutru, dar pot fi şi excepţii (*Sulfolobus* şi *Methanococcus*). Atunci când microorganismele sunt plasate în medii cu pH mai mic sau mai mare decât cel neutru, capacitatea de proliferare a acestora depinde de abilitatea lor de a aduce pH-ul mediului înconjurător la o valoare optimă. Când se află în medii acide, celulele trebuie fie să împiedice pătrunderea H^+, fie să elimine ioni H^+ la fel de rapid cum au intrat. Când majoritatea microorganismelor cresc în medii acide, activitatea lor metabolică are ca rezultat, faptul că, mediul sau substratul devine mai puţin acid, în timp ce microorganismele care cresc într-un mediu cu pH ridicat, tind să provoace o scădere a pH-ului. Decarboxilazele aminoacide, ce prezintă o activitate optimă la un pH în jur de 4,0 şi nici un fel de activitate la un pH de 5,5 produc o reglare spontană a pH-ului spre neutru atunci când celulele se dezvoltă în medii acide.

Clostridium acetobutylicum provoacă creşterea pH-ului substratului prin reducerea acidului butiric la butanol, în timp ce *Enterobacter aerogenes* produce acetoină din acid piruvic, pentru a creşte pH-ul mediului. Când aminoacizii sunt decarboxilaţi, creşterea pH-ului are loc datorită aminelor rezultate. Când creşterea are loc în limite alcaline, un grup de deaminaze aminoacide cu activitate optimă la un pH 8,0 provoacă reglarea spontană a pH-ului spre neutralitate, ca rezultat al acizilor organici care se acumulează.

În ceea ce priveşte transportul nutrienţilor, celule tind să aibă o încărcătură reziduală negativă. De aceea, compuşii neionizaţi pot intra în celulă, în timp ce compuşii ionizaţi nu au această posibilitate. În cazul pH-ului neutru sau alcalin, acizii organici nu intră în celule, în timp ce, în cazul unor valori de pH acide, aceşti compuşi sunt neionizaţi şi pot intra în celulele încărcate negativ.

Un alt efect advers al pH necorespunzător asupra microorganismelor este şi interacţiunea dintre H^+ şi enzimele din membrana citoplasmatică. Morfologia unor microorganisme poate fi afectată de pH. S-a raportat că lungimea hifelor de *Penicillium chrysogenum* scade când această ciupercă creşte într-o cultură continuă, în care valorile de pH au depăşit 6,0.

Miceliul se formează la un pH de aproximativ 6,7. Ionii de H^+ şi K^+ din spaţiul extracelular se pot afla în competiţie, atunci când ultimul timulează fermentarea, primul o reprimă. Spre exemplu, metabolizarea glucozei de către celulele levurice într-un mediu acid a fost considerabil stimulată de K^+. În condiţii anaerobe, glucoza a fost consumată în proporţie de 83%, în prezenţa ionilor K^+, iar în condiţii aerobe, în proporţie de 69%.

Există şi alți factori de mediu care interacționează cu pH-ul. În ceea ce priveşte temperatura, cu cât aceasta creşte mai mult, cu atât pH-ul substratului devine mai acid. Concentrația de sare are un efect net asupra curbelor ratei de creştere a pH-ului.

Când microorganismele se dezvoltă la ambele părți ale limitelor lor optime de pH, rezultă o fază de latență crescută, fiind de aşteptat să aibă o durată mai lungă, dacă substratul este foarte tamponat. Cu alte cuvinte, este de aşteptat ca durata *fazei de lag* să reflecte timpul necesar microorganismelor pentru a aduce mediul extern în limitele creşterii optime a pH-ului lor. Analiza substanțelor răspunzătoare de pH-ul advers este importantă nu numai pentru determinarea vitezei de creştere în continuare, dar şi pentru determinarea pH-ului minim la care salmonelele ar iniția creşterea.

Chung şi Goepfert au constatat că pH-ul minim a fost de 4,05, când s-a folosit acid clorhidric şi citric şi de 5,4 şi 5,5, când s-a folosit acid acetic, respectiv propionic. Aceasta este, fără îndoială, o reflectare a capacității microorganismelor de a aduce mediul lor extern în limite mai favorabile în cazul acidului clorhidric şi acidului citric, spre deosebire de alți acizi testați. Este, de asemenea, posibil, ca şi alți factori decât pH-ul să intervină în efectele variate ale acizilor organici ca inhibitori ai creşterii.

Umiditatea produselor alimentare (valoarea a_w). Deşi nu se ştie cu precizie cum a intrat în practică metoda uscării sau a desicației, ea este una dintre cele mai vechi modalități de de conservare a alimentelor.

Conservarea alimentelor prin uscare reprezintă o metodă de îndepărtare a apei, fără de care microorganismele nu au cum să supraviețuiască. Umiditatea produselor alimentare se exprimă în apă%. În microbiologie, interesează mai mult forma sub care apa se găseşte în produs şi dacă aceasta poate constitui un mediu bun pentru înmulțirea microbilor.

Activitatea apei (a_w) reprezintă procentul de apă „liberă”, conținută de aliment. Ea influențează creşterea şi activitatea metabolică a microorganismelor din aliment, ca şi rezistența lor față de diferiți factori, cum ar fi căldura, pH-ul sau radiațiile. Această tensiune relativă de vapori se notează cu simbolul a_w = „water activity” (activitatea apei). Acest parametru este definit prin raportul între presiunea vaporilor de apă din substratul alimentar (p) şi presiunea vaporilor de apă pură (p_o) la aceeaşi temperatură:

$$\mathbf{a_w = p/p_o}$$

p = presiunea vaporilor din soluție
p_o = presiunea vaporilor din solvent (de obicei apă)

Acest concept este legat de RH (umiditatea realativă) în următorul fel: RH = 100 x a_w. Apa pură are un a_w de 1,00, o soluție 22% NaCl are a_w de 0,86 şi o soluție saturată de NaCl a_w 0.75.

La majoritatea alimentelor proaspete a_w este de aproximativ 0,99. Valoarea minimă raportată a fi necesară pentru creşterea microorganismelor în alimente este prezentată în tabelul de mai jos. În general bacteriile solicită valori mari ale a_w decât cele ale fungilor, iar bacteriile Gram negative au cerinței mai mari decât cele Gram pozitive. Bacteriile cele mai alterative nu cresc sub valoarea a_w = 0,91, în timp ce mucegaiurile pot creşte până la 0,80. Unele bacterii implicate în toxiinfecții alimentare, cum este *Staphylococcus aureus* pot să se dezvolte până la 0,86, iar *Clostridium botulinum* nu se poate dezvolta sub 0,94.

Tabel 6.8.

Relația a_w - %NaCl

a_w	*Concentrația NaCl*	
	Molar	*%*
0,995	*0,15*	*0,9*
0,99	*0,30*	*1,7*
0,98	*0,61*	*3,5*
0,96	*1,20*	*7*
0,94	*1,77*	*10*
0,92	*2,31*	*13*
0,88	*3,33*	*19*
0,86	*3,81*	*22*

S-au observat o serie de coreații între valoarea a_w, temperatură şi nutrienți. Astfel, la orice temperatură abilitatea microorganismelor de a creşte este diminuată dacă valoarea a_w este scăzută, valoarea a_w peste care are loc dezvoltarea microorganismelor este cea mai mare la temperature optimă de creştere şi prezența nutrienților creşte valoarea a_w peste care organismul poate supraviețui.

Tabel 6.9.

Valoarea a_w minimă a unor microorganisme

Microorganismul	**a_w min**	**Microorganismul**	**a_w min**
Grupe		**Grupe**	
Bacteriile cele mai alterante	**0,90**	Bacterii halofile	**0,75**
Mucegaiurile cele mai alterante	**0,88**	Mucegaiuri xerofile	**0,61**
Drojdiile cele mai alterante	**0,80**	Drojdii osmofile	**0,61**
Organisme specifice		**Organisme specifice**	
Clostridium botulinum, tip E	**0,97**	*Candida scottii*	**0,92**
Pseudomonas spp.	**0,97**	*Trichosporon pullulans*	**0,91**
Acinetobacter spp.	**0,96**	*Candida zeylanoides*	**0,90**
Escherichia coli	**0,96**	*Geotrichum candidum*	**cca. 0,90**

Enterobacter aerogenes	**0,95**	*Trichothecium* spp.	**cca. 0,90**
Bacillus subtilis	**0,95**	*Byssochlamys nivea*	**cca. 0,87**
Clostridium botulinum, tip A şi	**0,94**	*Staphylococcus aureus*	**0,86**
B	**0,94**	*Alternaria citri*	**0,84**
Candida utilis	**0,94**	*Penicillium patulum*	**0,81**
Vibrio parahaemolyticus	**0,93**	*Eurotium repens*	**0,72**
Botrytis cinerea	**0,93**	*Aspergillus glaucus**	**0,70**
Rhizopus stolonifer	**0,93**	*Aspergillus conicus*	**0,70**
Mucor spinosus		*Aspergillus echinulatus*	**0,64**
		Zygosaccharomyces rouxii	**0,62**
		Xeromyces bisporus	**0,61**

Efectele negative ale unui a_w scăzut.

Efectul general al scăderii a_w sub valoarea optimă este creşterea lungimi fazei *lag* a creşterii şi scăderea ratei de creştere şi a mărimii populației finale. Acest efect poate fi aşteptat întrucât sunt afectate toate acitivățile metabolice, deoarece toate reacțiile chimice din celulă solicită un mediu apos. Cu toate acestea, valoarea a_w este influențată de alți parametrii ai mediului cum ar fi pH-ul, temperatura de creştere şi Eh. Wodzinski şi Frazier cercetând efectul a_w asupra creşterii *Enterobacter aerogenes* în medii de cultură au observat că durata generației creşte progresiv până la dispariția creşterii odată cu scăderea valorii a_w. Valoarea minimă a_w a fost obținută când temperatura de incubație a fost scăzută. Când atât pH-ul cât şi temperatura de incubație au fost nefavorabile valuarea minimă a_w necesară creşterii bacteirie a avut valori mai mari.

În general, strategiile angajate de microorganisme pentru a se proteja față de stresul osmotic este acela al acumulări intracelulare a unor soluții compatibile, cum sunt ionii de K^+, glutamat, glutamină, prolină, 7-aminobutirat, alanină, glicinbetaină, sucrosă, trehaloză şi glucosilglicerol. Bacteriile Gram negative au tendința de a acumula prolină printr-un mecanism de transport mărit. Într-un mediu de creştere cu nivel osmotic ridicat s-a observat că L-prolina măreşte creşterea *S. aureus* prin utilizarea unui sistem de transport de afinitate scăzută. Fungii halotoleranți şi xerotoleranți au tendința de a produce alcooli polihidrici cum sunt glicerolul, eritritolul şi arabitolul. *L. monocytogenes* cresc în culturi acumulând K^+, betaină şi glutamat, dar nu sunt dovezi că acestea ar acumula proline. Concentrația de aminoacizi din aceste organisme creşte de la 166 mM fără NaCl la 716 mM cu 7,5% NaCl, cu glicina şi alanina expunând cele mai mari valori.

În ceea ce priveşte compuşii specifici folosiți pentru diminuarea activității apei, s-au raportat rezultate asemănătoare celor observate cu sistemele de adsorbție şi desorbție.

Într-un studiu asupra a_w minim pentru creşterea şi germinarea bacteriei *Clostridium perfringens*, Kang şi col. au găsit valori cuprinse

între 0,97 şi 0,95, în mediile complexe când se foloseşte sucroză sau NaCl pentru reglarea a_w-ului şi de 0,93 sau mai puțin, când se utilizează glicerol. Într-un alt studiu s-a constatat că glicerolul este mai inhibitor decât NaCl față de bacteriile tolerante la sare, dar mai puțin inhibitor decât NaCl la speciile sensibile la sare, când comparația a fost efectuată la nivele similare de a_w în medii complexe. În studiile lor asupra germinării sporilor de *Bacillus* şi *Clostridium*, Jakobsen şi Murrell au observat o inhibiție accentuată a germinării sporilor, când a_w a fost controlat prin NaCl sau $CaCl_2$, inhibarea fiind mai redusă când s-a folosit glucoză sau sorbitol. Atunci când s-a utilizat glicerol, etilen, glicol, acetamidă sau uree, gradul de inhibiție a fost foarte redus.

Germinarea sporilor clostridiali a fost complet inhibată la un a_w=0,95 cu NaCl, dar nu a avut loc nici un fel de inhibiție când s-a folosit glicerol sau glucoză la acelaşi a_w. Într-un alt studiu a_w de limitare a formării unor spori maturi de tulpini de *B. cereus* s-a constatat că valoarea a_w este aproximativ 0,95, pentru glucoză, sorbitol şi NaCl şi de aproximativ 0,91 pentru glicerol. Atât levurile cât şi mucegaiurile s-au dovedit mai tolerante față de glicerol decât pentru sucroză. Folosind un mediu minim de glucoză şi *Pseudomonas fluorescens*, Prior a observat că glicerolul a permis o creştere la valori mai mici ale a_w-ului decât sucroza sau NaCl. Acest cercetător a demonstrat, de asemenea, inhibarea completă a catabolismului glucozei, lactatului de sodiu şi a DL-argininei când valorile a_w-ului sunt mai mari decât minimul pentru creştere şi când acesta este controlat de NaCl. Controlul a_w-ului cu glicerol a permis desfăşurarea în continuare a catabolismului, la valori a_w inferioare acelora pentru creşterea pe glucoză. În toate cazurile în care acest cercetător a folosit NaCl, pentru reglarea a_w-ului, catabolismul substratului a fost stopat la un a_w mai mare decât valoarea minimă pentru creştere, în timp ce glicerolul a permis continuarea catabolismului valorilor mai reduse decât valoarea minimă pentru creştere. În ciuda unor raporturi în care se arată contrariul, apare că glicerolul este mai puțin inhibitor pentru organismele aerobe decât agenți ca sucroza şi NaCl.

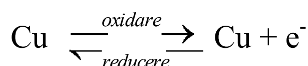
Levurile osmofile acumulează alcooli polihidrici până la o concentrație proporțională cu a_w-ul lor extracelular. Fungii xerofili acumulează soluții compatibile sau osmoregulatori, ca o consecință a necesității unor soluții interne cu valori mari, dacă este posibilă creşterea la un a_w scăzut. Într-un studiu comparativ al levurilor xerotolerante şi non-xerotolerante la stresul hidric, Edgley şi Brown, au demonstrat că *Zigosaccharomyces rouxii* a răspuns la un a_w redus, controlat de polietilen glicol, prin reținerea în înteriorul celulelor a nivelurilor crescânde de glicerol. Se remarcă însă că a_w-ul nu a modificat considerabil nici cantitatea şi nici nivelul arabitolului. Pe de altă parte *S. cerevisiae*

nontolerantă a răspuns la scăderea a_w-ului prin sintetizarea unei cantități mai mari de glicerol, dar prin reținerea unei mici cantități. Răspunsul lui *Z. rouxii* la un a_w redus s-a produs la nivelul de penetrație/transport al glicerolului, în timp ce răspunsul pentru *S. cerevisiae* a fost metabolic. Din acest studiu rezultă că un a_w scăzut forțează pe *S. cerevisiae* să devieze o producție mai mare din activitatea sa metabolică spre o producție de glicerol, însoțită de o mărire a cantității de glucoză consumată în timpul creşterii. Într-un studiu ulterior s-a consemnat că până la 95% din presiunea osmotică externă exercitată asupra lui *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* şi *Debaryomyces hansenii* poate fi echilibrată printr-o creştere a glicerolului. *Z. rouxii* acumulează mai mult glicerol sub stres, în timp ce ribitolul rămâne constant.

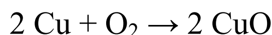
Unele celule se pot înmulți (în număr mare) la valori de a_w reduse, în timp ce anumite produse extracelulare lipsesc. De exemplu, un a_w redus poate avea ca rezultat oprirea producției de enterotoxină B de către *S. aureus*, chiar dacă în acelaşi timp se produce un număr mare de celule. În cazul speciei *Neurospora crassa*, o valoare de a_w redusă a avut ca rezultat alterări non-letale ale permeabilității membranei celulare, care au dus la pierderea mai multor molecule esențiale.

Rezultate similare s-au obținut cu electroliții sau nonelectroliții. În ansamblu, efectul unui a_w redus asupra nutriției microorganismelor apare ca fiind de o natură generală, acolo unde nevoile celulare ce trebuie mediate printr-un mediu apos sunt excluse (întrerupte) progresiv. Pe lângă efectul asupra nutrienților, un a_w redus are efecte adverse asupra funcționării membranei celulare, care trebuie menținută într-o stare fluidă. Este de aşteptat, tot ca o uscare a părților interne ale celulelor, să aibă loc la plasarea acestora într-un mediu cu a_w redus, până la un punct în care se produce echilibrul apei între celule şi substrat. Deşi, mecanismele nu sunt pe deplin elucidate, toate celulele microbiene pot necesita acelaşi a_w intern efectiv. Cele care pot creşte în condițiile externe ale unui a_w redus pot să crească în virtutea capacității lor de a concentra sărurile, poliolii şi aminoacizii (şi poate şi alte tipuri de compuşi) până la niveluri interne suficiente, nu numai pentru a împiedica pierderea apei de către celule, dar le pot permite acestora chiar să extragă apa din mediul extern sărăcit (în apă).

Potențialul oxidoreducător (POR) şi oxigenul molecular. Se ştie de câteva decenii că microorganismele prezintă grade diferite de sensibilitate la potențialul redox (O/R, Eh) al mediului lor de creştere. Potențialul O/R al unui substrat poate fi definit, în general, ca uşurința cu care substratul pierde sau câştigă electroni. Un aliment este oxidant când captează electroni şi este reducător când cedează electroni.



Oxidarea poate fi, de asemenea, obținută prin adăugarea de oxigen, după cum ilustrează următoarea reacție.



De aceea, o substanță care cedează uşor electroni este un bun agent reducător, iar unul care captează uşor electroni este un agent oxidant bun. Când se transferă electronii, de la un compus la altul se creează o diferență de potențial între cei doi compuşi. Această diferență poate fi măsurată cu ajutorul unui instrument adecvat şi poate fi exprimată în milivolți (mV). Cu cât va fi mai intens oxidată o substanță, cu atât va fi mai pozitiv potențialul său electric; cu cât o substanță va fi mai accentuat redusă, cu atât va fi mai negativ potențialul său electric. Când concentrația oxidantului este egală cu a reductantului există un potențial electric O. POR al unui sistem este exprimat prin simbolul Eh. Microorganismele aerobe necesită valori pozitive de Eh (oxidate) pentru creştere, în timp ce microorganismele anaerobe necesită valori de Eh negative (reduse). Printre substanțele din alimente care ajută la menținerea condiției reductoare sunt grupele SH din cărnuri şi acid ascorbic, precum şi zaharurile reductoare din fructe şi legume.

Potențialul redox al unui aliment este dat de următorii factori: (1) POR caracteristic al alimentului original; (2) capacitatea toxică; aceasta reprezintă rezistența la modificările potențialului alimentului; (3) temperatura oxigenului din atmosferă, din jurul alimentului; (4) accesul pe care atmosfera îl are în aliment.

În ceea ce privesc necesitățile de Eh ale microorganismelor, unele bacterii cer condiții reduse pentru inițierea creşterii (Eh aproximativ 200 mV), în timp ce altele cer valori ale Eh-ului pozitive, pentru creştere. În prima categorie se situează bacteriile anaerobe, ca genul *Clostridium*; în cealaltă se încadrează bacterii aerobe, ca unii membrii ai genului *Bacillus*. Unele bacterii aerobe cresc, în realitate, mai bine în condiții uşor reduse, iar aceste microorganisme sunt microaerofile. Exemple de astfel de bacterii sunt lactobacilii şi campylobacteriile. Unele bacterii au capacitatea de a creşte, atât în condiții aerobe, cât şi în condiții anaerobe. Aceste tipuri sunt denumite facultativ anaerobe. Majoritatea mucegaiurilor şi levurilor întâlnite în şi pe alimente sunt aerobe, însă unele tind să fie facultativ anaerobe.

Cu privire la Eh-ul alimentelor de origine alimentară şi vegetală, în special a sucurilor, acestea tind să aibă valori de Eh între 300 şi 400 mV.

Nu este surprinzător să constatăm că bacteriile şi mucegaiurile aerobe sunt o cauză obişnuită de alterare a produselor de acest tip. Cărnurile solide au valoarea Eh-ului în jur de 200 mV, iar valoarea Eh-ului cărnurilor tocate se situează, în general, în jur de 200 mV. Pentru brânzeturile de diferite tipuri s-au raportat valori Eh negative de la -20 mV la aproximativ -200 mV.

În ceea ce privesc valorile de Eh ale muşchilor *pre rigo*r în opoziție cu cele *post rigor*, Barnes şi Ingram au efectuat un studiu pentru măsurarea valorii Eh în muşchi, în decursul unor intervale de timp, până la 30 de ore, post mortem şi efectul asupra creşterii bacteriene anaerobe. Aceşti autori au constatat că Eh-ul muşchiului sternocefalic al calului imediat după moarte a fost de +250 mV, moment în care clostridiile nu s-au mai înmulțit. La 30 de ore postmortem, valoarea Eh-ului a scăzut la aproximativ 30 mV, în absența unei creşteri bacteriene. Când creşterea bacteriană a fost permisă, valoarea Eh-ului a scăzut la aproximativ 250 mV. Creşterea clostridiilor a fost observată la valori Eh de 36 mV şi mai scăzute. Aceşti autori au confirmat pentru carnea de cal constatarea făcută pentru carnea de balenă, şi anume că bacteriile anaerobe nu se înmulțesc până la apariția rigidității cadaverice, din cauza unei valori ridicate a Eh-ului în carnea pre-rigor. Acelaşi lucru este valabil şi pentru carnea de bovine, porc şi alte cărnuri de acest tip.

Efectele Eh-ului. Microorganismele afectează Eh-ul mediului înconjurător în cursul creşterii, la fel cum influențează şi pH-ul. Acest lucru este valabil, în special pentru aerobi, care pot micşora Eh-ul mediului înconjurător, spre deosebire de anaerobi, care nu pot efectua aceasta. Pe măsură ce cresc aerobii, are loc depleția oxigenului din mediu, având ca rezultat diminuarea Eh-ului. Creşterea, însă, nu e încetinită în măsura în care ar fi de aşteptat, din cauza capacității celulelor de a utiliza substanțe donatoare de oxigen sau cele acceptoare de hidrogen din mediu. Rezultatul este că mediul devine mai sărac în substanțe oxidante şi mai bogat în substanțe reducătoare. Valoarea Eh-ului unui mediu poate fi redusă de microorganisme prin producerea anumitor produse metabolice secundare, cum ar fi H_2S, care au capacitatea de a scădea Eh-ul până la -300 mV. Deoarece, H_2S reacționează rapid cu oxigenul se va acumula numai în mediile anaerobe. Eh-ul este dependent de pH-ul substratului, iar relația directă dintre aceşti doi factori este valoarea rH, definită în modul următor:

$$Eh = 2{,}303\frac{RT}{F}(rH - 2pH)$$

unde: R = 8,315 joules, F = 96,500 coulomb şi T este temperatura absolută. De aceea, pH-ul unui substrat trebuie stabilit când este determinat Eh-ul. În mod normal, Eh-ul este măsurat la un pH de 7,0, exprimat ca Eh 1,0 M = Eh_0' (ecuaţia simplificată a lui Hernst). În natură, Eh-ul tinde să fie mai negativ, în condiţii progresive alcaline.

Dintre nutrienţii care se găsesc în natură, acidul ascorbic şi zaharurile reductoare din plante şi fructe, precum şi grupele –SH din cărnuri prezintă o importanţă primordială. Prezenţa sau absenţa unor cantităţi adecvate de agenţi oxidoreducători într-un mediu are o valoare evidentă pentru creşterea şi activitatea tuturor microorganismelor.

În timp ce creşterea anaerobilor este considerată ca având loc în mod normal la valori reduse de Eh, excluderea oxigenului poate fi necesară pentru unii anaerobi. Când *Clostridium perfringens, Bacteroides fragilis* şi *Peptococcus magnus* au fost cultivate în prezenţa oxigenului, inhibarea creşterii s-a produs chiar când mediul are o valoare Eh neagativă de -50 mV. Aceşti cercetători au constatat că s-a produs creşterea în medii cu Eh ridicat până la 325 mV, când nu era prezent oxigenul.

În ceea ce priveşte, efectul Eh-ului asupra producţiei de lipide de către *Saccharomyces cerevisiae*, s-a observat că celulele crescute în condiţii anaerobe produc un nivel total mai redus, o tracţiune variabilă de gliceride şi cantităţi diminuate de componente fosfolipidice sau sterolice, comparativ cu celulele care cresc în condiţii aerobe. Lipidele produse de celulele care au crescut în condiţii anaerobe s-au caracterizat printr-un conţinut mare de acizi (până la 50% de acizi în total) de la 8:0 până la 14:0 şi printr-un nivel scăzut de acizi graşi nesaturaţi în fracţiunea fosfolipidică. În celulele crescute în condiţii aerobe 80-90% din componenta de acizi graşi a fost asociată cu un glicerid, iar fosfolipidele au fost găsite ca fiind acizi 16:1 şi 18:1. Spre deosebire de celulele aerobe, celulele anaerobe de *S. cerevisiae* au fost găsite ca având nevoi de lipide şi steroli.

Conţinutul în nutrienţi. Compoziţia chimică a alimentelor. Pentru o creştere şi funcţionare normală microorganismele importante din alimente au următoarele nevoi: 1. apă; 2. sursă de energie; 3. sursă de azot; 4. vitamine şi factori de creştere înrudiţi; 5. minerale.

Importanţa apei pentru creşterea şi dezvoltarea microorganismelor a fost prezentată mai înainte. În ceea ce privesc celelalte 4 grupe de substanţe, mucegaiurile au nevoile cele mai reduse, fiind urmate de bacteriile Gram negative, levuri şi de bacteriile Gram pozitive.

Ca surse de energie, microorganismele din alimente pot utiliza zaharuri, alcooli şi aminoacizi. Un mare număr de alţi compuşi de azot pot îndeplini această funcţie pentru diferite tipuri de microorganisme. De exemplu, unii microbi sunt capabili de a utiliza nucleotide şi aminoacizi

liberi, în timp ce alți microbi pot utiliza peptide şi proteine. În general compuşii simpli, cum sunt aminoacizii vor fi utilizați de aproape toate microorganismele înainte de a avea loc un atac asupra compuşilor mai complecşi, cum ar fi proteinele, cu greutate moleculară mare. Acelaşi lucru este valabil pentru polizaharide şi grăsimi.

Microorganismele pot necesita vitaminele B în cantități reduse şi aproape toate alimentele naturale ce conțin o cantitate abundentă pentru acele microorganisme, care sunt incapabile de a sintetiza factorii esențiali de creştere. Bacteriile Gram negative şi ciupercile sunt capabile de a sintetiza majoritatea sau totalitatea factorilor necesari pentru creştere.

Drept consecință, aceste două grupe de organisme pot creşte pe alimentele sărace în vitamina B.

Fructele tind să aibă un conținut mai redus în vitamina B decât cărnurile, iar acest fapt, împreună cu pH-ul de obicei redus şi cu Eh-ul pozitiv al fructelor, contribuie la explicarea alterării obişnuite a acestor produse de către mucegaiuri, mai degrabă decât de către bacterii.

Constituenții antimicrobieni. Stabilirea unor alimente față de atacul unor microorganisme se datorează prezenței anumitor substanțe existente în natură, care posedă şi manifestă o activitate antimicrobiană. Se cunosc unele specii de plante care conțin uleiuri esențiale ce posedă o activitate antimicrobiană. Dintre acestea sunt eugenolul din cuişoare, alicina din usturoi, aldehida cinnamică şi eugenolul din scorțişoară, alil-izotiocianatul din muştar, eugenalul şi timolul din salvie şi carvacrolul (izotimolul), timolul din oregano, capsicidina din ardei, acidul salicilic din zmeură, etc.

Laptele de vacă conține mai multe substanțe antimicrobiene, şi anume: lactoferina, conglutinina şi sistemul lactoperoxidazic. Laptele crud conține un retrovirus inhibitor ce poate inhiba până la 10^6 UFC (unități formatoare de colonii)/ml. Acesta este distrus prin pasteurizare. Cazeina din lapte, precum şi unii acizi apoşi liberi s-au dovedit a fi antimicrobieni înainte de conservare.

Ouăle, ca şi laptele conțin lizozim, iar această enzimă, împreună cu albumina conferă ouălor proaspete un sistem antimicrobian destul de eficient. Derivații acidului hidroxicinnamic (p-cumoric, feluric, caffeic şi acizii clorogenici) găsiți în fructe, legume, ceai melasă şi alte surse vegetale prezintă toți o activitate antimicrobiană şi o oarecare activitate antifungică. Lactoferina este o glicoproteină care fixează fierul şi este inhibitorie pentru o serie de bacterii din alimente. Ovotransferina este o substanță inhibitoare din albuşul de ou crud pentru *Salmonella enteritidis.*

Vacuolele celulare ale plantelor crucifere (varză, varză de Bruxelles, broccoli, guliile) conțin glucosinolați, care în caz de lezare sau ruptură mecanică eliberează izotiocianați. Unele din acestea din urmă

posedă activități antifungice şi antimicrobiene.

Sistemul lactoperoxidazic. Sistemul inhibitor ce se găseşte în mod natural în laptele de bovine, fiind alcătuit din trei compuşi: lactoperoxidaza, tiocianatul şi H_2O_2. Toate cele trei componente sunt necesare pentru obținerea de efecte antimicrobiene, iar psihotrofele Gram negative, ca pseudomonadele sunt foarte sensibile. Cantitatea de lactoperoxidază necesară este de 0,5-1,0 ppm, în timp ce laptele de bovine conține în mod normal aproximativ 30 ppm. Deşi, atât tiocianatul, cât şi H_2O_2 se găsesc în mod normal în lapte, cantitatea lor variază. În ceea ce priveşte H_2O_2, aproximativ 100 unități/mililitru sunt necesare în sistemul inhibitor, în timp ce în lapte se găsesc în mod normal numai 1-2 unități/mililitru. Un nivel eficient de tiocianat este în jur de 0,25 mM, în timp ce în lapte, cantitatea sa variază între 0,02 şi 0,25 mM.

Când sistemul lactoperoxidazei din laptele crud a fost activat prin adăugarea de tiocianat la 0,25 mM, împreună cu o cantitate echimolară de H_2O_2, durata valabilității produsului a fost prelungită cu 5 zile, față de 48 de ore la martori. Sistemul a fost mai eficient la 30°C, decât la 4°C. Efectul antibacterian creşte cu aciditatea, iar membrana citoplasmatică se dovedeşte a fi ținta celulară. Pe lângă adăugarea directă de H_2O_2, poate fi utilizată o sursă exogenă prin adăugarea de glucoză şi glucoză oxidază. Pentru a se evita adăugarea directă a glucozo-oxidazei, această enzimă a fost imobilizată pe perle de sticlă, astfel încât glucoza e generată numai în cantități necesare prin utilizarea β-galactozidazei imobilizată. Acest sistem a fost eficient în laptele de capră împotriva speciei *P. fluorescens* şi *E. coli*, a căror creştere a fost controlată timp de 3 zile pentru prima specie şi de 2 zile pentru a doua, la 8°C.

Sistemul lactoperoxidazei poate fi utilizat pentru păstrarea laptelui crud în țările în care nu se obişnuieşte refrigerarea. Adăugarea de aproximativ 12 ppm de SCN^- şi 8 ppm de H_2O_2 ar trebui să fie inofensive pentru consumator. Un aspect interesant al acestui sistem este efectul pe care îl are asupra proprietăților termice. Într-un studiu s-a arătat că reduce valorile termice D la 57,8°C cu aproximativ 80% pentru *Listeria monocytogenes* şi aproximativ 86% pentru *Stp. aureus* la 55,2°C. Deşi, mecanismul acestei distrucții termice crescute este neclar, pot fi luate în considerare unele implicații interesante.

Structura biologică a alimentelor. Învelişul natural al unor alimente conferă o protecție excelentă împotriva pătrunderii şi lezării consecutive de către microorganismele care alterează alimentele. În această categorie se încadrează structuri ca: învelişul semințelor, învelişul fructelor, coaja nucilor, a ouălor, pielea animalelor. În cazul unor nuci cum sunt pecanele (*Carya olivae formis*) şi nucile (*Juglans regia*), învelişul lor este suficient pentru a împiedica pătrunderea tuturor

microorganismelor. Odată ce acest înveliş este fisurat, miezul nucilor este expus alterării de către mucegaiuri. Învelişul extern şi membranele ouălor, când sunt intacte, împiedică pătrunderea aproape a tuturor microorganismelor, dacă acestea sunt păstrate în condiții adecvate de umiditate şi temperatură. Fructele şi legumele cu înveliş deteriorat se alterează mult mai rapid decât cele care nu au învelişul afectat. Pielea care acoperă peştii şi cărnurile (vită, porc) împiedică contaminarea şi alterarea acestor alimente în parte din cauză că aceasta tinde să se usuce mai rapid decât suprafețele tăiate proaspăt. Adunați la un loc, aceşti şase parametri intrinseci reprezintă calea naturală de prezervare a țesuturilor de plante şi animale împotriva atacului microorganismelor. Prin determinarea măsurii în care fiecare din aceste microorganisme există într-un aliment dat. Se pot prevedea tipurile generale de microorganisme din alimentul respectiv, determinându-se astfel stabilitatea generală a acestuia. Determinarea lor ar putea, de asemenea, contribui la stabilirea vârstei şi, probabil a istoricului de manipulare a alimentelor.

6.10.2. Influența parametrilor extrinseci ai alimentelor asupra microorganismelor

Factorii extrinseci ai alimentelor nu sunt dependenți de substrat. Ei reprezintă acele proprietăți ale mediului de conservare care influențează atât alimentele cât şi microorganismele din acestea. Parametrii cei mai importanți pentru bunăstarea microorganismelor din alimente sunt următorii: (1) temperatura de depozitare; (2) umiditatea relativă a mediului înconjurător; (3) prezența şi concentrația gazelor din spațiul de depozitare; (4) prezența şi activitatea altor microorganisme.

Temperatura de depozitare. Microorganismele, atât individual, cât şi în grup, cresc în limitele unei game foarte largi de temperatură. De aceea este bine să considerăm aici limitele temperaturilor de creştere pentru microorganismele importante din alimente ca un ajutor în alegerea temperaturii adecvate pentru depozitarea diferitelor tipuri de alimente. Temperatura minimă la care a fost raportată creşterea unui microorganism este de -34°C, iar temperatura maximă depăşeşte 100°C. Se obişnuieşte ca microorganismele să fie împărțite în trei grupe, pe baza temperaturii necesare pentru creştere. Microorganismele care cresc bine la 7°C sau sub această valoare, optimul lor fiind situat între 20°C şi 30°C sunt denumite psihotrofe. Cele care se dezvoltă bine între 20 şi 45°C, cu temperatura optimă între 30 şi 40°C sunt mezofile, în timp ce cele care cresc bine la 45°C şi peste această valoare se numesc termofile.

Bacteriile psihotrofe se încadrează în următoarele genuri: *Alcaligenes, Shewanella, Brochothrix, Corynebacterium, Flavobacterium, Lactobacillus, Micrococcus, Pectobacterium, Pseudomonas,*

Psychrobacter, Enterococcus şi altele. Psihotrofele cele mai frecvente din alimente sunt cele care fac parte din genurile *Pseudomonas* şi *Enterococcus*. Aceste microorganisme cresc bine la temperatura de refrigerare şi provoacă, la 5-7°C, alterarea cărnurilor, peştilor, cărnii de pasăre (de curte), a ouălor şi a altor alimente păstrate în mod normal la această temperatură. Numărul de plăci standard al numărului de celule viabile de pe aceste alimente este în general mai mare, când plăcile sunt incubate la aproximativ 7°C, timp de cel puțin 7 zile, decât când sunt incubate la 30°C şi mai mult. Speciile şi tulpinile mezofile fac parte din numeroase genuri, putând fi găsite pe alimentele păstrate la temperatura de refrigerare, dacă condițiile sunt favorabile. Se pare că ele nu cresc la această temperatură ci la temperaturi încadrate în limitele bacteriilor mezofile. Trebuie semnalat faptul că unele microorganisme pot creşte între 0°C şi peste 40°C. Un astfel de exemplu îl constituie *Enterococcus faecalis*.

Majoritatea bacteriilor termofile importante din alimente aparțin genurilor *Bacillus, Paenibacillus, Clostridium, Geobacillus, Alicyclobacillus* şi *Thermoanaerobacter*. Deşi, nu toate speciile din aceste genuri sunt termofile, ele prezintă un mare interes pentru microbiologii şi tehnologii alimentari din industria fabricării conservelor.

Mucegaiurile sunt capabile de a creşte în limite mari ale presiunii osmotice, ale conținutului nutrienților şi ale temperaturii (ca şi bacteriile). Multe mucegaiuri sunt capabile de a se dezvolta la temperatura de refrigerare, în special unele tulpini de Aspergillus, Cladosporium şi Thamnidium, care pot fi găsite pe ouă, porțiunile laterale ale cărnii de vită şi pe fructe. Levurile cresc deasupra limitelor de temperatură ale microorganismelor psihrofile şi mezofile, dar în general nu şi în limite termofile.

Calitatea unui produs alimentar trebuie, de asemenea, luată în considerare în alegerea temperaturii de păstrare. Deşi, ar părea de dorit ca toate alimentele să fie păstrate la 4°C sau sub această temperatură, aceasta nu reprezintă măsura cea mai bună în menținerea calității alimentelor.

De exemplu, bananele se păstrează mai bine la 13-17°C decât la 5-7°C, iar unele legume, la aproximativ 10°C, incluzând cartofii, țelina, varza şi multe altele. În fiecare caz, succesul temperaturilor de păstrare depinde în mare măsură de umiditatea relativă a mediului de depozitare şi de prezența sau absența unor gaze ca CO_2 şi O_3.

Temperatura de depozitare reprezintă parametrul cel mai important care produce alterarea alimentelor de înaltă perisabilitate, acest fapt fiind subliniat de către Olley şi Ratkowsky. Conform acestor cercetători, degradarea alimentelor poate fi prevăzută de o curbă a ratei de alterare. Curba generală de alterare a fost încorporată în circuitul unui integrator al

funcției de temperatură pe care se citesc zilele echivalente de depozitare la 0°C. S-a arătat că rata de alterare a cărnii proaspete de pasăre la 10°C este de aproximativ două ori mai mare decât la 5°C şi la 15°C, de aproximativ trei ori mai mare decât la 5°C.

În locul utilizării legii Arrhenius s-a stabilit următoarea formulă pentru a descrie relația dintre temperatură şi rata de creştere a microorganismelor, între temperaturile minime şi cele optime.

$$\sqrt{r} = B(T - T_0)$$

unde r este rata de creştere, B reprezintă panta liniei de regresie, iar T_0 este o temperatură conceptuală, lipsită de semnificație metabolică. S-a dovedit că relația liniară se aplică la bacteriile şi la fungii de alterare, când se dezvoltă în alimente sau când utilizează aminoacizii.

Umiditatea relativă a mediului înconjurător (atmosferei). RH-ul mediului înconjurător sau presiunea vaporilor de apă este importantă, atât din punct de vedere al a_w-ului din alimente, cât şi din punct de vedere al creşterii microorganismelor de pe suprafața lor, deci a duratei de conservare. Excesul de umiditate care se formează la suprafața alimentelor se datorează vaporilor din atmosferă şi apei din produs. Când a_w-ul unui aliment este reglat la 0,60 este important ca alimentul să fie conservat în condiții de umiditate relativă, care să nu permită ca alimentele să capteze umiditatea din aer şi să-şi crească a_w-ul propriilor suprafețe şi subsuprafețe, până la punctul la care se poate produce creşterea microbiană.

Când alimentele cu valori ale a_w-ului reduse sunt plasate în medii cu umiditate relativă ridicată, acestea captează umiditatea, până la stabilizarea unui echilibru. De asemenea, alimentele cu un a_w ridicat pierd apa din produs când sunt plasate într-un mediu cu umiditate relativ redusă. În general, cu cât temperatura este mai ridicată, cu atât e mai redusă umiditatea relativă şi viceversa.

Alimentele care suferă alterarea suprafețelor de către mucegaiuri, levuri şi unele bacterii, trebuie păstrate în condiții de umiditate relativ redusă. Carnea incorect învelită, cum ar fi cea de pui sau de vită, tind să aibă suprafața serios alterată, înainte de alterarea în profunzime, din cauza RH-ului, în general ridicat din frigider, cât şi datorită faptului că biota de alterare a cărnii este, în esență, de natură aerobă. Deşi, în cazul anumitor alimente este posibilă reducerea şanselor de alterare superficială a suprafețelor, prin depozitarea în condiții de RH reduse, trebuie ținută seama şi de faptul că alimentul însuşi (în astfel de condiții) va pierde din apa proprie.

În alegerea unor condiții de RH adecvate ale mediului înconjurător trebuie luată în considerare, atât posibilitatea creşterii microorganismelor pe suprafața alimentului respectiv, cât şi posibilitatea degradării calității acestuia. Prin modificarea atmosferei gazoase este posibilă întârzierea alterării de suprafață, fără scăderea umidității relative.

Prezența şi concentrația gazelor în mediul înconjurător. Dioxidul de carbon este unul dintre cele mai importante gaze implicate în creşterea sau inhibarea creşterii microorganismelor din alimente. *Ozonul (O_3)* este un gaz atmosferic cu proprietăți antimicrobiene, încercându-se, de-a lungul mai multor decenii folosirea sa ca agent pentru prelungirea valabilității anumitor alimente. S-a dovedit că este eficient împotriva diverselor microorganisme, însă datorită faptului că reprezintă un oxidant puternic, nu poate fi utilizat în cazul alimentelor cu conținut mare de lipide, deoarece ar provoca o creştere a râncezirii. Ozonul a fost testat împotriva speciei *E. coli* O157:H7 în mediul de cultură şi la 3 până la 18 ppm bacterian a fost distrusă în 20-50 minute. Când gazul a fost administrat dintr-un generator de ozon şi pe agar cu soia triptic (tripticază soia), valoarea D pentru 18 ppm a fost de 1,18 minute, dar în tampon fosfat, valoarea D a fost de 3,18 minute. Pentru a obține o inactivare de 99% a aproximativ 10.000 de chişti de *Giardia lamblia* pe mililitru, timpul mediu de concentrare a fost de 0,17 şi 0,53 mg-min/L la 25°C şi respectiv 5°C. Protozoarele a fost de 3 ori mai sensibil la ozon de 25°C decât la 5°C.

Este admis în alimente, în Australia, Franța şi Japonia, iar în 1997 i s-a acordat statusul GRAS („generally regarded as safe", „în general considerat ca inofensiv”) în SUA, pentru utilizarea în alimente. În ansamblu, nivelul de ozon din aer în limitele 0,15 - 5 ppm s-a dovedit a inhiba creşterea unor bacterii de alterare şi a unor levuri.

Capitolul 7
Genuri bacteriene izolate frecvent din alimente

Acinetobacter ([1]Gr. *akinetos*, incapabile de mişcare, imobile; n. Gr. *bakteria*, baston; n. N.L. *bacter*, bastor (în bacteriologie un bacil); n. masc. N.L. *Acinetobacter*, un bacil imobil). Acestea sunt larg răspândite în sol şi apă şi pot fi izolate din multe sortimente alimentare, în special din produsele proaspăt refrigerate. Multe din caracteristicile ecologice, taxonomice, fiziologice şi genetice ale acinetobacteriilor permit dezvoltarea unor aplicații biotehnologice particulare. *Acinetobacter spp.* exprimă un metabolism versatil, sunt robuste şi unele tulpini pot constitui sistemul necesar unor manipulări biomoleculare moderne, care sunt destinate obținerii unor produşi prin inginerie genetică. Aceste caracteristici sunt deja exploatate în diferite aplicații biotehnologice cum sunt biodegradarea şi bioremedierea, producerea de noi lipide şi peptide, obținerea de enzime, producerea de biosurfactanți şi biopolimeri. Se anticipează că domenile de utilizare oferite de *Acinetobacter* vor mări sfera aplicabilității biotehnologiilor moderne.

Aeromonas (n. Gr. *aer aeros*, aer; n. Gr. *monas -ados*, o unitate, o monadă; n. fem.) este un gen în care sunt incluse bacterii tipic acvatice, ce produc cantități importante de gaze din zaharurile fermentate. Unele dintre acestea sunt locuitorii normali ai intestinelor de peşte, iar altele sunt patogene pentru aceştia. Numai una din cele şase specii ale genului este cunoscută ca patogenă pentru oameni: *Aeromonas hydrophila*. Această specie poate fi găsită în mediul acvatic precum şi în mâncare, fiind ubicvitară. *A. hydrophila* poate cauza la oameni infecții, adesea fatale, cu localizare intestinală sau la nivelul altor organe şi țesuturi cum ar fi: gastroenterite, septicemie, meningită şi penumonie. *Aeromonas hydrophila* (specia tip) este rezistentă la numeroase antibiotice uzuale cum ar fi penicilina şi ampicilina. Este de asemenea rezistentă la refrigerare, se poate dezvolta la temperaturi scăzute (25^{o}C) la fel de bine ca şi la 37^{o}C şi rezistă la clor. Datorită prevalenței mari în mediul acvatic, *A. hydrophila* poate produce o patologie deosebită la peşti, ce se manifestă prin necroza cozii şi a aripioarelor, septicemie hemoragică, căderea solzilor, ulcere, precum şi infecții la nivel hepatic sau renal.

---

[1]**Abrevieri:** adj.: adjectiv; adj. verb.: verb adjectival; adv.: adverb; dim.: diminutiv; fem.: feminin; gen. : genitiv; Gr.: din greacă (se transcriu cuvintele în alfabetul latin); L.: din latina clasică; L.M.: din latina medievală; masc.: masculin; n.: nominativ; N.L. : neo-latină, neologisme utilizate ca un cuvant latin; neut.: neutru; part.: participiu; pl.: plural; pref. : prefix; prep: prepoziție; suf. : sufix; sup.; superlativ; v.: verb.

Alcaligenes (n. arab al kaïda, baza, alcalin; n. Franceză „alcali"; v. Gr. *gennao*, produce, generează; n. masc. N.L. *Alcaligenes*, (bacterii) producătoare de alcali) sunt bacterii Gram-negative, patogen-oportuniste, ubicvitare, descompun substraturi din cele mai diverse şi sunt izolate cel mai frecvent din lapte crud, produse din pasăre şi fecale. De asemenea, acestea se mai pot izola din arborele respirator al pacienților cu fibroză chistică.

Alteromonas ([2]n. Gr. *alteros*, alta, altul; n. Gr. *monas -ados*, o unitate, o monadă; N.L. *Alteromonas* altă monadă) Bacterii care populează apele mărilor în regiunile de coastă putând fi izolate din alimentele recoltate de aici. Toate speciile acestui gen au nevoie pentru creştere de salinitatea apei marine.

Arcobacter ([2]n. L. *arcus -us*, arc; n. Gr. *bakteria*, baston; n. N.L. *bacter*, baston (în bacteriologie - bacil); n. masc. N.L. *Arcobacter*, un bacil curb sau arcuit) se izolează de la păsările de curte, din moluşte, lapte crud, apă şi produse de vită şi porc. Unele specii pot fi implicate în avorturi şi enterite atât la animale cât şi la om.

Bacillus ([2]n. masc. L. *bacillus*, bastonaş şi în bacteriologie bacil; n. masc. N.L. *Bacillus*, numele unui gen bacterian care reuneşte bacterii ce au formă de bacil) Genul conține două specii patogene *B. anthracis* (agentul etiologic al antraxului) şi *B. cereus*. Deşi majoritatea tulpinilor celui din urmă sunt nepatogene, unele cauzează gastroenterite de etiologie alimentară.

Brevibacillus ([2]adj. L. *brevis -is -e*, scurt; n. dim. n. masc. L. *bacillus*, bastonaş şi în bacteriologie bacil N.L. *Brevibacillus*, bacil scurt) reuneşte bacterii clasificate anterior în genul *Bacillus*, care se găsesc în sol şi apă, deobicei pe plante, în aer sau în praf.

Brochothrix ([2]adj. Gr. *Brochos,* ansa, n. Gr. *trix,* fir) aceşti bacili sunt înrudiți cu genurile *Listeria* şi *Lactobacillus* dar prezintă şi unele caractere comune cu genul *Micobacterium*. Uzual se izolează din carnea proaspătă sau procesată care este conservată prin refrigerare în pachete impermeabile pentru gaze.

Burkholderia ([2]n. fem. N.L. *Burkholderia*, în onoarea bacteriologului W.H. Burkholder) cuprinde bacterii ce pot fi izolate de pe plante, în special pe unele flori, în lapte crud şi produc deteriorarea legumelor. Bacterile sunt patogene importante în patogeneza fibrozei chistice la om.

Camphylobacter (adj. Gr. *campylo*, curb, curbat; n. Gr. *bakteria*, baston; n. N.L. *bacter*, baston (bacteriologic, bacil); n. masc. N.L. *Campylobacter*, bacil curbat) prezintă un interes crescut pentru sănătatea publică prin două specii care produc campylobacterioză atât la om cât şi la animale: *Campylobacter jejuni* şi *Campylobacter coli*. Omul se

contaminează prin consum de carne şi lapte crude, carne semipreparată sau prin apă contaminată. Aceşti germeni se află la nivelul tractului intestinal al păsărilor sălbatice şi în cel al animalelor domestice. Carnea de pasăre vândută în magazine este mai des contaminată decât carnea roşie şi subprodusele din carne.

Carnobacterium (n. L. *caro carnis*,carne; n. dim. Gr. *bakterion*, bețisor (bacteriologic, bacil mic); n. neut. N.L. *Carnobacterium* (*sic*), bacil izolat din carne) acest gen reuneşte o serie de bacterii clasificate în trecut ca lactobacili, dar care din punct de vedere filogenetic sunt mult mai apropiate de enterococi şi vagacoci decât lactobacilii. Se diferențiază de lactobacili şi prin faptul că nu se pot dezvolta pe medii cu acetat şi prin capacitatea de a sintetiza acid oleic. Sunt heterofermentative şi majoritatea cresc la 0ºC, dar nici unul la 45ºC. Au fost izolate de pe suprafața cărnurilor ambalate în vid precum şi de pe carnea de pasăre.

Citrobacter (n. L. *citrus -i*, lămâie; n. Gr. *bakteria*, baston; n. N.L. *bacter*, baston (bacteriologic bacil); n. masc. N.L. *Citrobacter*, un bacil care utilizează citratul de sodiu) reuneşte bacterii izolate din tubul digestiv care fermentează lent lactoza şi produc colonii galbene pe plăcile cu agar. Specia izolată cel mai frecvent din alimente este C. freundii. Speciile acestui gen se dezvoltă şi pe zarzavaturi sau legume precum şi pe carnea proaspătă.

Clostridium (n. Gr. *closter*, fus; n. dim. neut. N.L. *Clostridium*, un fus mic) este un gen ce include atât specii mezofile, cât şi specii psihotrofe şi termofile. Sunt larg răspândiți în natură, la fel ca şi opuşii lor bacilii aerobi formatori de spori. Genul contine multe specii, dintre care unele produc înbolnăviri la om.

Corynebacterium (n. Gr. *coryne -es*,măciucă; n. dim. Gr. *bakterion*, bețişor, bastonaş -bacteriologic, un bacil mic; n. neut. N.L. *Corynebacterium*, un bacil mic în formă de măciucă) sunt bacterii implicate în deterioarea produselor vegetale şi a celor din carne. Majoritatea sunt mezotrofe deşi se cunosc şi specii psihotrofe, una dintre acestea din urmă, *Corynebacterium diphtheriae* fiind agentul etiologic al difteriei umane.

Enterobacter (n. Gr. neut. *Enteron -ou*, intestin; n. masc. L.M. *bacter*, echivalent cu *bacterium*, un bacil mic; n. masc. L.M. *Enterobacter*, un bacil intestinal mic) bacili intestinali, Gram negativi, care solicită condiții de cultivare similare cu cele ale enterobacteriaceelor, chiar dacă, în general, nu sunt adaptate tractului gastrointestinal.

Enterococcus (n. Gr. *Enteron -ou*, intestin; n. Gr. *coccos -ou*, bob; n. masc. N.L. *Enterococcus*, un coc intestinal) acest gen cuprinde coci din grupul serologic Lancefield D. Acest gen s-a extins la peste 16 specii de celule oxoide, Gram pozitive ce apar în câmpul microscopic singure, în

perechi sau în lanțuri scurte. În trecut erau incluse în genul *Streptococcus*. Unele specii nu reacționează cu antiserurile de grup D.

Erwinia (n. fem. L.M. *Erwinia*, în onoarea primului fitobacteriolog Erwin F. Smith) este un gen de *Enterobacteriaceae* format în principal din specii bacteriene patogene pentru plante. De *Erwinia amylovora* sunt atacate mai ales gutuiul, părul şi unele soiuri de măr la care produce focul bacterian al rosaceelor.

Escherichia (n. fem. N.L. *Escherichia*, în onoarea bacteriologului care a descris specia tip T. Escherich, 1857-1911) este genul bacterian cu cele mai studiate specii. Specie tip a genului, *E. coli* este o bacterie uzual întâlnită în intestinul subțire al animalelor cu sânge cald, dar capacitatea acesteia de a supraviețui perioade scurte de timp în afara organismului face din ea un organism indicator pentru testarea contaminării fecale a probelor de mediu şi alimente. Bacteria poate fi izolată şi cultivată uşor, are o genetică simplă, uşor de manipulat, ce face ca această specie să fie una din cele mai bine studiate modele procariote şi cu importantă deosebită în biotehnologie.

Flavobacterium (adj. L. *flavus -a -um*, gălbui; n. dim. Gr. *bakterion*, un bețişor (în bacteriologie, un bacil mic); n. neut. N.L. *Flavobacterium*, un bacil gălbui) bacili Gram negativi caracterizați prin producerea în agar a unor pigmenți de la galben la roşu şi prin asocierea lor cu plantele. Unele specii sunt mezotrofe, iar altele sunt psihotrofe, participând la alterarea cărnii şi a legumelor refrigerate. Flavobacteriile sunt în general bacterii comensale care trăiesc în sol şi apă şi sunt patogeni oportunişti.

Kocuria (n. fem. N.L. *Kocuria* în onoarea lui M. Kocus) gen nou separat din genul *Micrococcus*, reuneşte specii uzual izolat de pe pielea omului. *K. rosea şi K. kristinae* sunt asociate mai des cu bacteriemia asociată cateterelor sau post-investigații laparoscopice. Organismele sunt larg răspândite în natură şi frecvent se izolează şi din flora normală a pielii altor mamifere. Sunt puține studii ce detaliază infecțiile cu *Kocuria spp.*

Hafnia grupează bacili Gram negativi prezintă o importanță deosebită în alterarea cărnurilor refrigerate şi a produselor vegetale. *Hafnia alvei* este singura specia a genului, este mobilă, lizină şi ornitină pozitiv şi are un conținut în G+C mol% ADN de 48-49.

Lactobacillus (n. L. *lac lactis*, lapte; n. L. *bacillus* (ou *bacillum*) -*i*, bețişor, baston mic - în bacteriologie un bacil mic; n. masc. N.L. *Lactobacillus*, bacil din lapte) include un grup important din bacteriile acidolactice. Sunt bacterii Gram pozitive, catalază negative care se grupează în lanțuri lungi. *L. suebicus* a fost izolată din mere şi pere uscate şi creşte la un pH de 2,8 în etanol 12-16%. Pe baza datelor de secvențializare a ARN 16S, au fost identificate 3 grupe distincte

filogenetic şi este posibil ca genul să sufere cât de curând o reclasificare. Deşi speciile izolate din alimente sunt de tip microaerofil, există şi multe tulpini anaerobe, izolate în special din rumenul erbivorelor şi intestinul gros la om. Marea majoritate a acestora se izolează de pe numeroase leguminoase şi prezența lor în produsele lactate este frecventă. Unele specii de *Lactobacillus* sunt utilizate industrial la producerea iaurturilor, brâzeturilor, fermentarea verzei, murăturilor, berii, vinului, cidrului, kimchi-ului şi a altor mâncăruri fermentate, precum şi a silozurilor. Pâinea sourdough este fabricată utilizând o „cultură starter" reprezentată de o cultură simbiotică de drojdi şi bacteri acidolactice crescute în mediu cu apă şi făină de grâu. Lactobacilii, în special *L. casei* and *L. brevis* sunt unele din cele mai comune organisme de degradare a berii.

Lactococcus (n. L. *lac lactis*, lapte; n. Gr. *coccos -ou*, bob; n. masc. N.L. *lactococcus*, coc din lapte) cuprinde coci ce au aparținut serogrupului N al genului *Streptococcus*. Sunt coci Gram pozitivi, imobili, catalază negativi, sferici sau ovali, ce se găsesc singuri sau se grupează în perechi sau lanțuri scurte. Cresc la $10^{o}C$, dar şi la $45^{o}C$, iar majoritatea tulpinilor reacționează cu antiserul de grup N. Acidul L-lactic reprezintă principalul produs final al fermentației. Specia tip a genului este *Lactococcus lactis*, cu două subspecii *L. lactis lactis* şi *L. lactis cremoris*. *Lactococcus lactis* este unul din cele mai importante microorganisme implicate în industria laptelui. Este o bacterie nepatogenă esențială în prepararea unor produse din lapte cum este babeurre-ul, iaurtul sau brânza. Când *L. lactis ssp. lactis* este adăugat în lapte bacteria utilizează enzimele pentru a produce molecule de energie, denumite ATP, din lactoză. Bioprodusul energiei ATP este acidul L-lactic. Acidul lactic produs de către bacterii coagulează laptele care apoi se separă, cu formarea brânzei şi zerului. *Lactococcus lactis* este utilizat şi la prepararea legumelor murate, berii, vinului, unor sortimente de pâine şi sausage şi a altor alimente fermentate. Cercetătorii anticipează că prin descifrarea fiziologiei şi prelucrarea genetică a acestora, bacteriile vor căpăta o valoare inestimabilă în industria alimentară şi farmaceutică, ce explorează capacitatea lui *L. lactis* de a fi un vehicul de furnizare a medicamentelor.

Leuconostoc (adj. Gr. *leucus*, clar, luminos; n. neut. L.M. *Nostoc*, nume gen alge; n. neut. L.M. *Leuconostoc*, drojdie fără culoare - incolor) clasifică un alt gen de bacterii lactice, coci Gram pozitivi, catalază negativi (care-i diferențiază de stafilococi) şi heterofermentativi. Uzual, aceşti coci se asociază cu lactobacilii şi sunt acuzați că stau la baza mirosului neplăcut de la prepararea „culturii starter" pentru pâinea sourdough. Unele specii sunt capabile să producă infecții umane, dar fiincă acestea nu sunt uzuale în etiologia bolilor umane, kiturile de diagnostic standard existente în comerț nu sunt concepute să le identifice.

Listeria (n. fem. N.L. *Listeria*, în onoarea chirurgului Lord Joseph Lister, 1827-1912) acest gen conține 6 specii de bacterii Gram pozitive, neformatoare de spori, fiind strâns înrudit cu *Brachothrix*. Cele 6 specii au pereți celulari, acizi graşi şi compoziția citocromilor identice. Specia tip a geului este *Listeria monocytogenes,* o bacterie uzual izolată din sol, apă curgătoare, canalizare, plante şi mâncare. *Listeria* reprezintă agentul etiologic al listeriozei, o toxiinfecție alimentară gravă ce poate duce la decesul a 25% din oamenii îmbolnăviți. Sunt deosebit de rezistente şi capabile să crească în intervalul termic 4°C - 37°C.

Micrococcus (adj. Gr. *micro,* mic; Gr. *coccos -ou*, bob; n. masc. N.L. *Micrococcus*, un coc mici) se izolează din cele mai variate habitate, apă, gunoaie şi sol. Sunt coci Gram pozitivi izolați şi de le pielea mamiferelor, dezvoltându-se în prezența unor niveluri mari de NaCl. În prezent *M. luteus* şi *M. lylae* sunt singurele specii ale genului.

Moraxella (suff. dim. L. *-ella*; n. fem. N.L. *Moraxella*, în onoarea oftalmologului V. Morax, 1866-1935) cuprinde bacterii comensale ale suprafețelor mucoase şi care uneori determină infecții oportuniste. Organismele sunt bacili sau cocobacili Gram negativi, scurți, sau cum este cazul speciei *Moraxella catarrhalis*, diplococi, catalază şi oxidază pozitivi. *Moraxella catarrhalis* este cea mai importantă specie a genului. Au un metabolism oxidativ şi nu formează acid din glucoză.

Paenibacillus (adv. L. *paene*, aproape; n. N.L. *Bacillus*, nume gen bacterian; n. masc. N.L. *Paenibacillus*, aproape un *Bacillus* sp. -apropiați de genul *Bacillus*) este un gen bacterian relativ recent ce cuprinde microorganisme incluse în genul *Bacillus* sau *Clostridium*: *P. alvei, P amylolyticus, P azotofixans, P circulans, P durum, P larvae, P macerans, P macquariensis, P pubuli, P pulvifaciens* şi *P validus*. Recent au fost adăugate două specii noi (*P. lautus* şi *P. peoriae*). Bacterii Gram-labile, mobile, aerobe sau facultativ anaerobe, chemo-organotrofe, xilanolitice. Paenibacilii sunt importanți pentru degradarea unor serii de macromolecule, pentru producerea de agenți antibacterieni şi antifungici, şi capacitatea de a fixa azotul în asociație cu plantele. O nouă specie a fost izolată din laptele crud şi cel tratat UHT (termic). Speciile asociate cu infecții umane (septicemii, meningite, pneumonii) sunt *P. alvei, P. macerans* şi *P. polymyxa.*

Pandoraea (suff. L. *-ea*; n. fem., Gr. Pandora, prima femeie în mitologia greacă) au fost izolate pentru prima dată din sputa unor bolnavi cu fibroză chistică. Cu toate că nu s-a demonstrat a fi germeni obişnuiți ai alimentelor, specia *P. noriumbergenesis* a fost izolată din laptele praf. Datele clinice disponibile indică implicarea patologică a acestor bacterii în o serie de infecții cronice şi posibilitatea transmiteri de la pacienții cu fibroză cistică.

Pantoea *(*suff. L. *–ea, Fr. panto-,* . L., Gr. *pant-, panto-, pant-, peste tot, toate*) este un gen bacterian care cuprinde bacili drepți, Gram negativi, necapsulogeni, nesporogeni, majoritatea flagelați peritrich, incluşi în grupa coliformilor (parametru evaluat în analiza calității apei sau a sănătății publice). Aceştia se pot izola de pe suprafața plantelor, semințelor, în sol, apă şi din intestinul oamenilor. Unii sunt patogeni pentru plante. Cele 4 specii recunoscute au fost în trecut clasificate ca enterobacterii sau erwinii. *P. agglomerans* include speciile *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola* şi *E. milletiae*; *P.ananas* include speciile *Erwimia ananas* şi *E. uredovora*; *P.stewartii* a fost denumită în trecut *E. stewartii*; *P. dispersa* este o specie nou descrisă. Un test API 20E poate fi un ajutor în identificarea corectă a speciei. Conținutul în G+C al ADN este 49,7 până la 60,6 mol%

Pediococcus (adj. Gr., Fr. *pedion,* o suprafață plană, n. masc. Gr. *coccos -ou*, bob; n. masc. N.L. *Pediococcus*, coci care cresc într-un plan) conține lactococi homofermentativi, Gram-pozitivi, ce se înmulțesc prin diviziunea celulelor în unul sau două planuri de simetrie formând grupări diploide sau terade. *P acidilactici* este specia tip şi a fost citată într-un caz de septicemie la un bărbat de 53 de ani. Uzual pediococii sunt considerați contaminanți ai berii şi vinului, deşi prezența lor este uneori nedorită în anumite tipuri de bere cum este Lambic (sortiment de bere fabricat numai in regiunea Pajottenland din Belgia). Anumite izolate de *Pediococcus* produc diacetil, compus ce conferă o aromă specială anumitor sortimente de vin (ex. Chardonnay) şi bere. *Pediococcus* sp. sunt adesea utilizate ca inoculanți de însilozare pentru obținerea furajelor fermentate destinate hrănirii rumegătoarelor. Alături de alți lactobacili, cum sunt *Leuconostoc* şi *Lactobacillus*, pediococii sunt implicați şi în fermentarea verzei.

Proteus (n. masc. L. *Proteus -ei* (sau-*eos*), Proteus, zeu al mării în mitologia Greacă, ce posedă puterea divină a metamorfozei, numele de *Proteus* a fost dat unui gen bacterian ale cărui specii prezintă un polimorfism accentuat) este genul ce reuneşte un grup de bacterii ce au ca nişă ecologică tubul digestiv al omului şi animalelor. Sunt unii din principalii agenți ai proceselor de putrefacție din mediile naturale (sol şi apă) şi participă ca efectori ai circuitelor biogeochimice din natură. Prin supraînsămânțări în alimente pot duce al toxiinfecții alimentare şi sunt răspândite în alimentele proaspete, în special legume, carnea provenind de la păsările de curte şi în produsele marine. Deşi în trecut era genul cu cele mai multe bacterii izolate din alimente, acum a fost redus numeric prin transferul multor specii în alte genuri nou create: *Acidovorax, Aminobacter, Brevundimonas, Burkholderia, Comamonas, Delftia, Devosia, Herbaspirillium, Hydrogenophaga, Marinobacter, Ralstonia, Sphingomonas, Telluria* şi *Wantersia*. *P. fluorescens* şi *P. aeruginosa*

rămân în genul initial.

Psychrobacter (n. Gr. *psychros*, *psychein,* a face la frig; n. masc. L.M. *bacter*, echivalent cu *bacterium*, un bacil mic; n. masc. L.M. *Psychrobacter* , bacil care se dezvoltă la frig) este un gen creat în special pentru a include unii din bacilii Gram negativi, imobili, clasificați anterior în genurile *Acinetobacter* şi *Moraxella*. Psychrobacteriile sunt cocobacili ce se grupează în perechi, anaerobi, imobili, catalază şi oxidază pozitivi şi care nu fermentează glucoza. Creşterea acestora are loc în medii cu NaCl 60,5% şi în general la 1ºC, dar nu şi la 3,5 ºC sau 37 ºC. Se deosebesc de acinetobacterii prin faptul că sunt oxidază pozitivi şi utilizează aminovaleratul, iar spre deosebire de *Pseudomonas spp.* nu au capacitatea de a utiliza glicerolul sau fructoza. Se izolează frecvent de pe carnea de pui, peşte şi din apă.

Salmonella (suff. dim. L. -*ella*; n. fem. N.L. *Salmonella*, în onoarea bacteriologului D.E. Salmon, 1850-1914). Specia tip este reprezentată de *Salmonella enterica*. Există peste 2500 de serovaruri (serotipuri) care se notează, de exemplu, astfel: *Salmonella enterica* serotipul Newport sau *Salmonella* Newport (de notat că serotipul nu este italicizat). Conținutul moleculei de ADN în G+C este de 50-53mol%. Sunt bacterii Gram negative considerate în ansamblul lor, indiferent de serotip, virtual patogene pentru om şi, în concluzie, obligatoriu absente din alimente. *Salmonella spp.* populează tractul intestinal al oamenilor şi altor animale, inclusiv al păsărilor. Acestea sunt uzual transmise la om prin alimente contaminate cu fecale de animale. Salmonelele pot determina toxiinfecții alimentare (salmoneloză) şi prin contaminare încrucişată. De exemplu, dacă sucul ce provine din carnea proaspătă infectată vine în contact cu alimente neprelucrate termic sau deja preparate (aşa cum sunt salatele), acestea pot constitui surse de infecție. Alimentele se pot contamina şi prin „mâinile nespălate" ale unui bucătar infectat. De asemenea pot fi găsite şi în fecalele unor animale de companie, în special la cele cu diaree. Oamenii se pot contamina dacă nu se spală pe mâini după ce manipulează aceste fecale. În mod particular reptilele pot fi purtătoare de salmonele, de aceea oamenii care le manipulează trebuie să se spele pe mâini în timpul cel mai scurt, chiar dacă acestea sunt aparent sănătoase. Orice produs alimentar proaspăt de origine animală, cum sunt carnea, laptele, produsele lactate, ouăle, fructele de mare şi unele legume şi fructe pot fi purtătoare de salmonele. Bacteria poate supraviețui şi produce îmbolnăviri dacă produsele din carne şi ouă nu sunt gătite corespunzător, la o temperatură care garantează distrugerea lor, şi dacă legumele şi fructele nu sunt spălate energic la jet de apă. Salmonelele pot contamina şi alte alimente ce vin în contact cu carnea proaspătă. Bunele practici de manipulare a alimentelor sunt absolut necesare în prevenirea

transmiterii bacteriei din carnea proaspătă.

Serratia (n. fem. N.L. *Serratia*, în onoarea inginerului S. Serrati, secolul XVIII). Bacili Gram negativi, incluşi în familia *Enterobacteriaceae*, aerobi, proteolitici şi care în general produc prodigiozină pe nucleele de cultură şi pe alimente, deşi tulpinile nepigmentogene nu sunt o raritate. *Serratia liquefaciens* este specia cel mai frecvent izolată din alimente. Aceasta produce alterarea produselor vegetale şi a cărnii refrigerate.

Shewanella (suff. dim. L. -*ella*; n. fem. N.L. *Shewanella*, în onoarea bacteriologului J.M. Shewan) este genul bacterian în care sunt grupate unele bacterii incluse anterior în *Pseudomonas putrefaciens* şi ulterior în *Alteromonas putrefaciens,* iar la această dată formează specia *S. putrefaciens*. Aceştia sunt bacili drepți sau curbi, Gram negativi, nepigmentogeni, oxidează pozitivi cu un conținut în G+C de 44-47 mol%. Alte trei specii ale genului sunt *S. hanedai, S. benthica şi S. colwelliana*. Toate sunt asociate cu habitatele acvatice sau marine, iar creşterea speciei *S. benthica* este stimulată prin presiune hidrostatică.

Shigella (v suff. dim. L. -*ella*; n. fem. L.M. *Shigella*, în onoarea bacteriologului K. Shiga, 1871-1951). Toti membrii acestui gen sunt prezumtiv enteropatogeni umani sau ai altor primate, dar nu şi al altor mamifere. Infecția se produce uzual prin contaminare fecalo-orală, iar în funcție de vârstă şi starea generală a gazdei numai câteva celule bacteriene pot fi suficiente pentru a declanşa o infecție. Ca rezultat al distrucției celulelor mucoasei intestinale de la nivelul cecumului şi rectului *Schigella sp.* determină dizenterie.

Sphingomonas (adj. Gr. *sphingo-, sphingen*, ataşare rapidă; n. Gr. *monas -ados*, unitate, monadă; n. fem. N.L. *Sphingomonas*, o monadă care aderă repede) Exista 33 de specii Gram negative. Aceste bacterii produc un pigment galben tipic şi au fost incluse în genul *Flavobacterium*. Sphingomonele sunt larg răspândite în natură, fiind izolate din numeroase habitate terestre şi acvatice, precum şi din rădăcinile plantelor, legumelor, probe recoltate de la animale şi din alte surse. Unele sphingomone (în special *Sphingomonas paucimobilis*) pot juca şi un rol în patologia umană, în principal prin producerea unor infecții nosocomiale ce pot fi tratate uşor prin antibioterapie. Datorită capacității lor biodegradative şi biosintetice, sphingomonele sunt deja utilizate într-o gamă largă de aplicații biotehnologice, de la bioremedierea contaminanților din mediu la producerea de polimeri extracelulari cum sunt sfinganii (ex: gelan, welan şi rhamsan) utilizați pe scară largă în industria alimentară şi în alte industrii. O tulpină de *Sphingomonas* sp. 2MPII, poate degrada 2-methylphenanthrene.

Staphylococcus (n. Gr. *staphule -es*, ciorchine de struguri; n. Gr.

coccos -ou, bob; n. masc. N.L. *Staphylococcus*, coci grupați în ciorchine de strugure) cuprinde bacterii Gram pozitive incriminate în producerea unei varietăți mari de boli la om şi animale, atât prin producția de toxine cât şi prin capacitatea invazivă. Specia tip a genului este *S. aureus* care provoacă mai multe sindroame la om inclusiv gastroenterite alimentare. Poate supraviețui chiar şi pe suprafețele uscate, ceea ce impune o abordare tranşantă a strategiei de prevenire şi combatere a transmiterii acesteia la om. Toxinele stafilococice sunt principala cauză a „otrăvirii" alimentelor şi nivelul acestora poate fi crescut în alimentele păstrate în condiții improprii. Deşi procesul de gătire le ucide, enterotoxinele sunt termo-rezistente şi pot supraviețui fierberii timp de mai multe minute. Stafilococii se pot dezvolta şi în alimentele cu o cantitate de apă relativ scăzută (cum sunt salamurile uscate şi unele sortimente de brânză).

Stenotrophomonas. (adj. Gr. *stenos*, strâmt; n. Gr. *trophos*, acela care hrăneşte; n. Gr. *monas -ados*, o unitate, o monadă; n. fem. N.L. *Stenotrophomonas*, o monadă, o bacterie care utilizează un număr limitat de substraturi nutritive). Bacili Gram negativi, aerobi şi nefermentativi care se izolează din plante (promotori ai creşterii sau semibionți în rizosfera mai multor plante agricole), sol, apă şi lapte. Incadrată taxonomic inițial în genul *Pseudomonas* şi apoi în *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas maltophila* (specia tip) este considerată la această dată ca a 2-a bacterie nasocomială, cea mai frecventă după *Pseudomonas aeruginosa*. *Stenotrophomonas rhizophila* a fost folosită pentru controlul şi combaterea infecțiilor fungice la plante.

Vagococcus (n. masc., Fr. vagabond, Eng. vagrant, călător, nomad, n. Gr. *coccos -ou*, bob; n. masc. N.L. *Vagococcus*, coci migratori, nomazi) ca gen a fost propus în 1989 pentru a grupa cocii mobili asemănători lactobacililor, ce erau definiți anterior ca „lacto-streptococi mobili" (lactobacili serogrupul N), şi la care secvențializarea ARNr 16S a demonstrat că sunt diferiți față de toți lactobacilii cunoscuți. Sunt bacili flagelați peritrih, Gram pozitivi şi catalază negativi ce se dezvoltă la 10^oC dar nu şi la 45^oC, în medii cu NaCl 4%, dar nu şi la 6,5%; nu se dezvoltă la un pH de 9,6. Stratul de peptidoglican al peretelui celular este compus din Lis-D-Asp, iar conținutul ADN-ului în G+C este de 33,6 mol%. Foarte puține specii produc hidrogen sulfurat. Se găsesc în peşte, fecale şi apă. Specia tip a genului este *Vagococcus fluvialis*, a cărei caracterizare a dus la formarea acestui gen. Investigații taxonomice moleculare ulterioare au dus la identificarea unei a doua specii, denumită *Vagococcus salmoninarum*. Deşi distinct, genul *Vagococcus* a are o strânsă legătură filogenetică cu genurile *Enterococcus* şi *Lactococcus*, iar unele specii sunt foarte greu de diferențiat pe baza caracterelor fenotipice. Există o serie de comunicări referitoare la izolarea de la peştii (salmonide) bonavi a lui *V.*

salmoninarum şi de la animalele domestice a lui *V.fluvialis*, dar semnificaţia lor pentru patologia umană rămâne încă necunoscută. Posibila implicare a vagococilor în infecţii umane rămâne valabilă, dacă se ia în considerare dificultatea identificării lor, care poate duce la identificarea greşită sau ignorarea acestora.

Vibrio, (v. L. *vibro*, a imprima o mişcare vibratorie, a agita, a vibra; n. masc. N.L. *Vibrio*, cel care vibrează, ce se mişcă rapid) sunt bacili drepţi sau curbi, Gram negativi, membrii ai familiei *Vibrionaceae*. O serie de specii ce au aparţinut acestui gen sunt acum incluse în genul *Listonella*. Unele specii produc la om gastroenterite sau septicemii, în principal prin consumul alimentelor neprelucrate termic ce conţin creveţi sau crabi, dar şi prin consumul de apă contaminată (*Vibrio cholerae*). ADN-ul acestor bacterii conţine 38-51 G+C mol%. Specile patogene de *Vibrio* sunt *V. cholerae* (agentul etiologic al holerei), *V. parahaemolyticus* şi *V. vulnificus.* Multe alte specii au şi caracter zoonotic, ele producând boli, adesea mortale, la peşti şi moluşte.

Weissella (v suff. dim. L. -*ella*; n. fem. L.M. *Weissela*, în onoarea bacteriologului N. Weiss). Acest gen de bacterii acidolactice a fost creat 1990 pentru a clarifica poziţia taxonomică a „ramurii leuconostoc" a lactobacililor. Utilizând atât datele secvenţializării ARNr 16S cât şi 23S, Martinez-Murcia şi Collins (1990) and Martinez-Murcia *et al*. (1993) au arătat că *Leuconostoc paramesenteroides* este distinct filogenetic de *Leuconostoc mesenteroides* şi acesta se grupează cu alţi cinci lactobacili heterofermentativi *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* şi *Lactobacillus viridescens*. În 1993 Collins *et al*. trec în revistă organismele leuconostoc-like izolate din mezelurile fermentate, ceea ce a dus la identificarea speciilor ce formează genul *Weissella*: fostul *Leuconostoc paramesenteroides,* cei cinci lactobacili prezentaţi anterior şi o specie nou izolată *Weissella hellenica*. La această dată sunt indexate în gen peste 50 de specii. Tulpinile *Weissella* au fost izolate dintr-o varietate de surse. *Weisella paramesenteroides* este una din cele mai frecvent izolate specii în legumele proaspete şi joacă un rol important în prima fază a procesului de fermentare a silozurilor. *Weisella halotolerans*, *Weisella hellenica* şi *Weisella viridescens* au fost uzual asociate cu carnea şi produsele din carne, în timp ce habitatul natural al *Weisella kandleri* nu este cunoscut. Se consideră că tulpina tip a speciei *Weisella kandleri* îşi are habitatul în unele specii de plantele de deşert. *Weisella confusa* a fost identificată în zahărul din trestie, sucul de morcovi şi ocazional în laptele crud şi apa menajeră/uzată. Tulpinile *Weisella minor* utilizate la descrierea taxonomică au fost izolate din sedimentul maşinilor de lapte. *Weisella thailandensis* a fost izolată din produse fermentate tailandeze din peşte,

dar în Asia de Sud-Est weisellele au fost izolate şi din alte produse alimentare tradiționale cum sunt tapai (aliment fermentat şi dulce pe bază de orez) şi chili bo (produs nefermentat cu cili şi amidon din cereale şi alte ingrediente perisabile). Conținutul în G+C al ADN-ului este de 37-47 mol%.

Yersinia (n. fem. N.L. *Yersinia*, în onoarea bacteriologului elvețian A.J.E. Yersin, 1863-1943). În acest gen este inclus agentul pestei umane, *Y. pestis*, specii care produc gastroenterite, *Y. enterocolitica*, şi septicemii cu limforeticulite, *Y. pseudotuberculosis*. Rozătoarele sunt rezervorul natural, iar alte mamifere pot fi gazde în mai mică măsură. Infecția se poate transmite transcutanat prin sânge (*Y. pestis*) sau pe cale digestivă prin consum de produse alimentare contaminate cu urină sau fecale (în special prin legume, lactate şi carne). Implicarea unui mecanism protozoonotic în transmiterea yersiniilor nu este cert, dar se ştie că aceştia sunt paraziți facultativ intracelulari. Cercetarea posibilei propagări şi proliferări a yersiniilor prin vectori amoeba (prin stadiul de chist al protozoarului) reprezintă o temă de cercetare actuală. Dintre caracteristicile fiziologice ale *Yersinia sp.* de reținut este capacitatea de a supraviețui şi prolifera la temperaturi de 1-4^{o}C (ex. în produsele alimentare păstrate la temperatura frigiderului). În plus, aceasta prezintă o rezistență semnificativă şi la temperaturi ridicate, reuşind să supraviețuiască până la 20-30 minute la 50-60^{o}C şi să nu fie distrusă prin procesul de pasteurizare standard a laptelui (15 secunde la 72^{o}C). Totuşi, yersinile sunt inactivate rapid de agenți oxidanți cum sunt apă oxigenată şi permanganatul de potasiu. Conținutul G+C mol% al ADN-ului este 45,8-46,8.

Capitolul 8
Ciuperci microscopice izolate frecvent din alimente

8.1. Mucegaiuri izolate frecvent din alimente

Mucegaiurile sunt fungi filamentoşi care cresc sub forma unei mese încolăcite şi se răspândesc rapid putând acoperi o suprafață de mai mulți centimetrii în numai 2-3 zile. Întreaga structură sau numai o porțiune din aceasta este denumita miceliu. Un miceliu este format din ramuri sau filamente denumite hife. Cele mai importante se înmulțesc prin ascospori, zigospori sau conidii. Ascosporii unor genuri se remarcă prin gradul lor ridicat de rezistență la temperaturi ridicate. Un grup formează picnidii sau acervuli (celule mici în formă de flacon, iar corpii de fructificare sunt conidiofori). Artrosporii rezultă din fragmentarea hifelor din unele grupe. Cele mai importante observații din ultimii douăzeci de ani referitoare la sistematica fungilor transmisibili prin alimente sunt despre descoperirea înmulțirii sexuate sau perfecte a câtorva specii şi genuri binecunoscute. În această privință starea de ascomicet este considerată de micologi ca fiind starea reproductivă cea mai importantă a unor fungi, stare denumită teleomorfă. Numele de specie dat unei ciuperci teleomorfe are prioritate față de cel ce defineşte starea anamorfă (denumire dată stării imperfecte sau conidiale). Termenul holomorf arată că sunt cunoscute ambele stadii, dar este utilizat termenul teleomorf.

Pozițiile taxonomice ale genurilor descrise sunt rezumate mai jos:
Diviziunea: *Zygomycota*
Clasa: *Zygomycetes* (miceliu neseptat, reproducere prin sporangiosporii, creştere rapidă)
Ordinul: *Mucorales*
Familia: *Mucoraceae*
Genuri: *Mucor, Rhizopus, Thamnidium*
Diviziunea: *Ascomycota*
Clasa: *Plectomycetes* (miceliu septat, ascosporic ce produc usual 8 asci)
Ordinul: *Eurotiales*
Familia: *Trichocomaceae*
Genurile: *Byssochlamys, Emericella, Eupenicillium, Eurotium*
Diviziunea: *Deuteromycota* („imperfectele”, anamorfe, stadiile perfecte nu sunt cunoscute)
Clasa: *Coelomycetes*

Genul: *Colletotrichum*

Clasa: *Hypomycetes* (hife producătoare de conidii)

Ordinul: *Hyphomycetales*

Familia: *Moniliaceae*

Genurile: *Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium (Pullularia), Botrytis, Cladosporium, Fusarium, Geotrichum, Helminthosporium, Monilia/Sclerotinium, Penicillium, Stachybotrys, Trichothecium*

Cele mai importante genuri ale micologiei alimentare vor fi în continuare descrise succint.

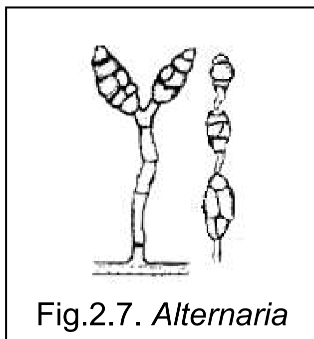


Fig.2.7. *Alternaria*

Alternaria: fungi responsabili de „putregaiul" fructelor cu sâmburi, al merelor şi smochinelor precum şi de putregaiul negru al citricelor. Alternariile sunt fungi de câmp care cresc pe grâu, dar se pot izola şi de pe cărnurile roşii. Acestea produc micelii septate cu conidiofori şi conidii cafenii mari. Unele specii produc micotoxine, dar majoritatea efectelor produse asupra sănătăţii animale şi umane nu sunt încă bine cunoscute. Nu toate specile de *Alternaria* sunt combătute şi considerate patogene, chiar mai mult, unele promit a fi arme de luptă ecologice contra unor plante dăunătoare.

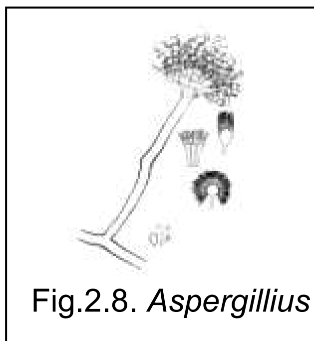


Fig.2.8. *Aspergillius*

Aspergillus: produce lanţuri de conidii. Când se dezvoltă cleistoteci[2] cu ascospori stadiul perfect al celor găsiţi în alimente este *Emericella, Eurotium* sau *Neosartorya*. *Eurotium* (fostul grup *A. glaucus*) produce chistoteci de culoare gălbui deschisă, toate speciile fiind xerofile. *E. herbariorum* produce deteriorarea gemurilor şi jeleurilor de struguri. *Emericella* produce cleistoteci albi, iar *E. nidulans* este teleomorfa speciei *Aspergillus nidulans*. *Neosartorya* produce cleistoteci albi şi ascospori incolori. *N. fischeri* este termorezistentă, iar rezistenţa sporilor săi este similară cu cea a celor de *Byssochlamys*. Aspergilii apar pe un număr mare de alimente, fiind pigmentaţi în galben-verde până la negru. Putregaiul negru al piersicilor, citricelor şi smochinelor constituie una din condiţiile alterării fructelor. Unele specii se găsesc şi pe şunca afumată la ţară sau pe slănină, iar altele produc alterarea uleiurilor de palmier, alune şi porumb. *A. oryzae*

[2] Cleistoteci = ascele se formează în periteci complet închise, una câte una. Ascocarp = ascofruct = corp de fructificaţ ie = structură fungică cu complexitate variabilă ce poartă asce şi ascospori.

şi *A. soyae* sunt implicate în fermentația shogu, iar ultimul în fermentația koji. *A. glaucus* produce katsuobushi, un produs oriental din peşte fermentat. Grupul *A. glaucus-A. restrictus* contine fungi de depozitare care invadează semintele, boabele de soia si fasolea. *A. niger* produce β-galactozidază, glucoamilază, invertază, lipază şi pectinază, iar *A. oryzae* produce α-amilază. Două specii produc aflatoxine şi altele produc ocratoxină A şi sterigmatocistină.

Aureobasidium *(Pullularia)*: sunt fungi de culoare închisă, cu largă răspândire în mediu, ce sunt uzual izolați din deşeuri de plante, sol, lemn, țesături şi din aerul spațiilor închise. *A. pullulans* (*Pullularia pullulans*) este cel mai frecvent contaminant alimentar. Se pot izola şi din creveți, sunt responsabili de „boala petelor negre ale cărnii de vită" conservată pe termen lung şi sunt frecvent întâlnite pe fructe şi legume. Patogenitatea *Aureobasidium* rămâne însă limitată şi neobişnuită. La om au fost raportate micoze cutanate, respiratorii, peritonite şi o serie de infecții aureobasidiale oportuniste.

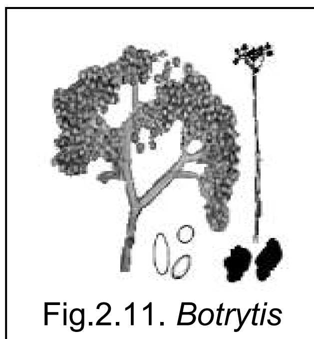


Fig.2.11. *Botrytis*

Botrytis: au conidioforii lungi, subțiri şi adesea pigmentați. Miceliul este septat, conidiile sunt prezente pe celulele apicale, de culoare cenuşie sau neagră şi uneori se produc sclerote[3] neregulate. *Botrytis cinerea* este ce mai frecventă specie găsită în alimente. Aceşti fungi sunt importanți pentru că produc mucegaiul gri al merelor, perelor, zmeurei, căpşunilor, strugurilor, merelor, citricelor şi al unor fructe cu sâmburi.

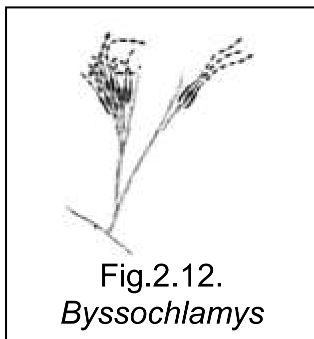


Fig.2.12. *Byssochlamys*

Byssochlamys: acest gen este teleomorfa unor specii de *Paecilomyces*, fungi neizolați din alimente. Importanța bisoclamidilor rezidă din termorezistența lor şi capacitatea de a altera unele alimente acide. În timpul creşterii pot tolera valori potential reduse de oxidoreducere. Unele specii sunt producătoare de pectinaze, iar *Byssochlamys fulva* şi *Byssochlamys nivea* alterează fructele conservate şi îmbuteliate. Aceşti fungi sunt cel mai frecvent incriminați în degradarea fructelor şi sucurilor de fructe.

Cladosporium: este un gen fungic ce cuprinde unele din cele mai

[3] *sclerotium (Ag)* = un corpuscul de dimensiuni variabile format dintr-o masă indurată de hife cu sau fără ţ esut gazdă prezentând o scoarţ ă de culoare închisă din care se pot dezvolta conidiofori sau micelii.

întâlnite mucegaiuri. Aceştia se caracterizează prin producerea de hife septate cu conidii arborescente de culoare închisă, cu ramificaţii diverse. În culturi are o creştere catifelată, colorată în măsliniu până la negru. Unele conidii au formă de lămâie. *Cladosporium herbarum* produce pete negre pe carnea de vită şi oaie congelată. Pot altera untul şi margarina, iar unele specii provoacă putregaiul fructelor şi strugurilor. Sunt fungi de câmp care cresc pe grăunţele de orz şi grâu. Sunt rar patogene pentru oameni, dar au fost raportate ca responsabile de unele infecţii cutanate şi ale unghiilor precum şi de infecţii sinusale şi pulmonare.

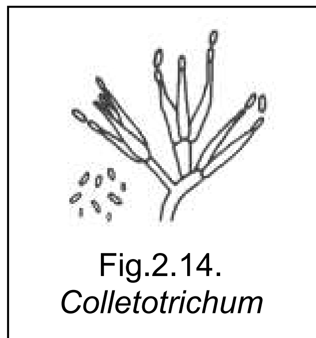


Fig.2.14. *Colletotrichum*

Colletotrichum: fac parte din clasa *Coelomycetes* şi formează conidii în interiorul acervulilor. Formează conidiofori simpli elongaţi şi conidii hialine unicelulare ovoide sau dolice. Au formă de disc sau de pernă, ceroase şi în general de culoare închisă. *Colletotrichum gloeosporioides* se poate izola din alimente, ea produce antracnoză în special pe fructe tropicale ca mango şi papaya. Sunt foarte rar implicate în patologia umană şi a animalelor, fiind raportate câteva cazuri de cheratite micotice, în principal după leziuni oculare, şi infecţii consecutive bolilor imunosupresive.

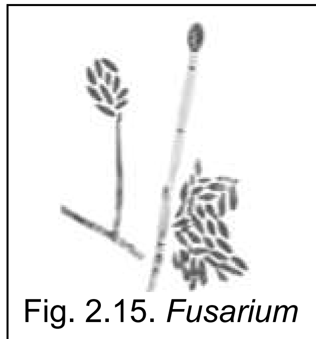
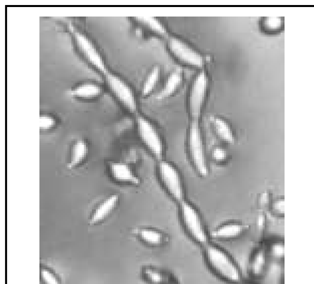


Fig. 2.15. *Fusarium*

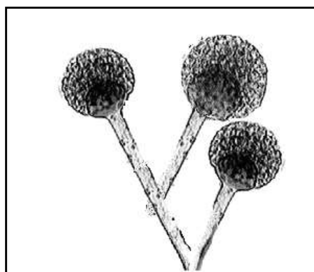
Fusarium: formează un miceliu închis cu aspect vătos cu nuanţe de roz, roşu, purpuriu sau cafeniu. Macroconidiile sunt septate, având forma fusiformă până la falciformă (în formă de seceră). Produc putregaiul moale al smochinelor. Ca fungi de câmp unele specii se dezvolta pe grăunţele de orez sau grâu. Unele specii produc tricotecene, fumonizine şi zearalenone. *Fusarium venenatum* este produs pe scară industrială pentru a fi utilizat ca aliment uman (*Quorn*).

Geotrichum (denumit anterior *Oidium lactis* şi *Oospora lactis*). Aceşti fungi drojdii-like au cel mai adesea culoarea alba, hifele septate, iar reproducerea are loc prin formarea de artroconidii din hifele vegetative. *Geotrichum candidum*, anamorfa lui *Dipodascus geotrichum* este cea mai importantă specie din alimente. Ea este cunoscută şi sub denumirea de „ciuperca lactică”, deoarece conferă aromă specifică multor tipuri de brânză sau „ciuperca de aparate” pentru ca se dezvoltă pe echipamentul ce vine în contact cu alimentele, în fabricile de procesare a alimentelor, în special în cele de conservare a tomatelor. Cauzează putregaiul acru al citricelor şi piersicilor, şi alterează smântâna. Au o răspândire destul de

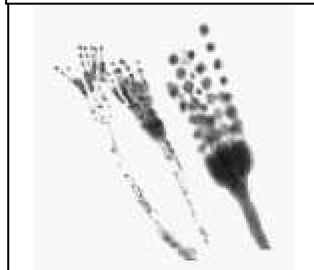
largă, putând fi găsite inclusiv pe carne şi legume.


Fig. 2.17. *Monilia*

Monilia/Sclerotinium: produce conidii roz, gri sau cafenii. *M. sitophila* este stadiul conidial al speciei *Neurospora intermedia*. *Monilia* este stadiul conidial al speciei *Monilinia fructicola*. Ele produc putregaiul cafeniu al fructelor cu samburi (piersici, caise). *Monilina sp.* provoacă mumificarea afinelor.


Fig. 2.18. *Mucor*

Mucor: hifele sunt neseptate şi produc sporangiofori purtători de columela cu sporangii la vârf. Numeroşii membrii ai acestui gen nu produc rizoizi sau stoloni. Produc colonii vătoase, iar unele specii produc „whiskers" (mustăți de pisică) la carnea de vită şi „puncte negre" ale cărnii de oaie congelată. Cel puțin o specie, *M. miehei*, produce lipază. Se gaseşte în alimente fermentate, bacon şi numeroase legume. Unele specii fermenteaza zerul de soia.


Fig. 2.19. *Penicillium*

Penicillium: conidioforii şi conidiile sunt singurele structuri de reproducție prezente, genul fiind plasat în clasa *Deuteromycota*. Sunt plasate între ascomicete atunci cand se formeaza *cleistochecii*[4] cu ascospori, ca de exemplu *Talaromyces sau Eupenicillium.* Dintre cele două genuri teleomorfe, genul *Talaromyces* este cel mai important în contaminarea alimentelor. *T. flavus* este teleomorfa lui *P. dangeardii* şi este implicat în alterarea concentratului de suc de fructe. Produce spori termorezistenți când se formează conidii în *Penicillium* acestea cad din fialide. Culorile tipice pe care le au în alimente sunt albastru sau albastru verzui. Unele specii produc putregaiul albastru şi verde al citricelor, strugurilor, perelor şi fructelor cu sâmburi.

Rhizopus: hifele aseptate produc stoloni şi rizoizi. Sporangioforii se dezvoltă tipic sub formă de ciorchine în capul stolanilor la punctul de origine al rizoizilor. *R. stolonifer* reprezintă specia cea mai frecvent izolată din alimente. Uneori sunt denumite „mucegaiurile pâinii" şi produc putregaiuri moi, apoase ale merelor, perelor, fructelor cu sâmburi, strugurilor, smochinelor si ale altor fructe. Unele produc „petele negre" ale cărnii de vită şi de oaie congelate. Pot fi găsite pe slănină şi pe alte

[4] *cleistocheci* = ascosporic închis în ascii dispersați aleator

produse de carne procesate. Unele produc pectinaze, iar *R. oligosporus* este important in producerea de oncom, bongkrek si tempeh.

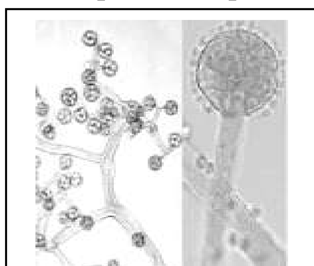


Fig. 2.21. *Thamnidium*

Thamnidium: aceste mucegaiuri produc sporangii mici purtate de structuri extrem de ramificate. *T. elegans* este specia cea mai cunoscută datorită faptului că se dezvoltă pe membrele posterioare ale cărnii de vită refrigerate, creşterea fiind cunoscută sub denumirea „whiskers". Acestea se pot izola şi din ouale alterate.

Trichothecium: hifele sunt septate purtând conidiofori lungi, subţiri şi simpli. *T. roseum* este singura specie de culoare roz şi produce mucegaiul roz al fructelor. De asemenea provoacă mucegaiul moale al dovlecilor găsindu-se frecvent pe orz, grâu şi porumb. Uneori produc micotoxine.

Alte mucegaiuri: Pe lângă mucegaiurile prezentate anterior mai sunt cunoscute şi alte genuri cu importanţă în microbiologia alimentară, care pot fi grupate în două categorii. Prima categorie este reprezentată de mucegaiuri prezente în unele alimente, dar care în general nu au o semnificaţie considerabilă: *Cephalosporium*, *Diplodia* şi *Neurospora*. *Cephalosporium* este un deuteromicet ce se găseşte pe carnea congelată. Microsporii acestui gen sunt asemănători cu cei ai unor specii de *Fusorium*. *Diplodia* este un alt deuteromicet care provoacă mucegaiul cafeniu apos al piersicilor. *Neurospora* este un ascomicet, iar *N. intermedia* este cunoscut sub denumirea de „mucegaiul roşu al pâinii". *Monilia sitophila* este anamorfa lui *N. intermedia*. Aceasta din urmă este importantă în fermentarea oncomului şi a fost găsită pe diferite cărnuri. „White spot" petele albe ale cărnii de vită este provocată de *Sporotrichum spp.*, iar mucegaiurile diverselor fructe sunt cauzate de *Gloeosporium spp.* Unele speciile de *Helminthosporium* sunt patogene, iar altele saprofite pentru foarte multe plante.

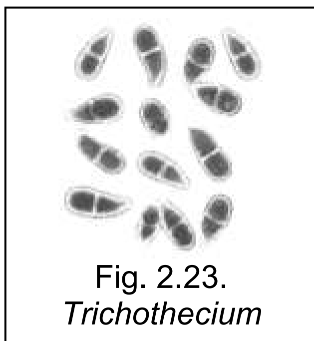


Fig. 2.23. *Trichothecium*

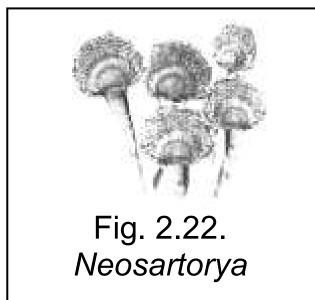


Fig. 2.22. *Neosartorya*

Neosartorya fischeri: (anamorfa lui *Aspergillus fischerianus*) a fost recunoscută ca fiind cauza alterării unor produse din fructe în anii 1960. Ascosporii săi sunt extrem de termorezistenţi, fiind capabili să reziste la fierbere în apa distilată timp de 1 oră, şi este micotoxinogen,

producând fumitremorgin A, B şi C; tereină, veruculogen şi fischerină.

Cea de a doua categorie conține mucegaiuri xerofile, cu rol foarte important în alterare. Pe lângă *Aspergillus* şi *Eurotium*, Pitt şi Hocking includ printre xerofile şi genurile: *Basipetospora, Chrysosporium, Eremascus, Polypaecilum, Wallemia şi Xeromyces*. Aceste mucegaiuri se caracterizează prin abilitatea lor de a creşte sub valoarea a_w (water activity) = 0,85. Ele se găsesc în alimentele ce-şi datorează conservabilitatea unui a_w redus. Dintre cele 6 genuri 2 merită a fi prezentate: *Wallemia* şi *Xeromyces*.

Wallemia: produce pe mediile de cultură şi pe alimente colonii de culoare cafenie. *W. sebi* este specia cea mai importantă şi poate creşte la a_w=0,69. Produce mucegaiul gri (dun) pe peştele uscat şi sărat.

Xeromyces: are o singură specie, *X. bisforus*, produce cleistoteci incolori cu ascii exanescente[5] ce conțin 2 ascospori. Acest microorganism are creşterea cea mai redusă în a_w dintre toate celelalte microorganisme cunoscute. Cauzează probleme la lichioruri, prune, ciocolată, sirop şi alte produse similare.

8.2. Principalele genuri de levuri izolate din alimente

Levurile pot fi considerate ca fungi unicelulari în contrast cu mucegaiurile care sunt multicelulare, totuşi aceasta nu reprezintă o definiție precisă, pentru că multe din levurile obişnuite produc în realitate micelii cu grade variate.

Levurile pot fi diferențiate de bacterii atât prin dimensiunile mai mari ale celulelor lor cât şi prin formele acestora care sunt ovale, alungite, elipsoidale sau sferice. Celulele levurice tipice au un diametru ce variază între 5-8 µm, unele fiind chiar mai mari.

Culturile mai vechi prezintă celule mai mici. Majoritatea levurilor importante din alimente se divid prin înmugurire sau fisiune.

Levurile pot creşte în limite mai largi ale pH-ului acid şi în etanol până la 18%. Multe cresc în prezența sucrozei 55-60%. Produc mulți pigmenți mergând de la crem până la roz şi roşu. Ascosporii şi artrosporii unor levuri sunt termorezistenți.

În ceea ce priveşte taxonomia ciupercilor, în deceniul trecut s-au folosit metode mai noi, ce constau dintr-o compoziție bazică de ARNr 5S, ADN şi din profiluri ale coenzimei Q.

Din cauza dimensiunilor mari ale genomului levurilor, analizele secvențelor de ARNr 5S se folosesc mai mult pentru fracțiunile de ARN mai mari.

[5] *exanescente* = care dispar repede

În sistematica levurilor s-au produs multe modificări, datorită folosirii unor metode mai noi, dar şi datorită unei filozofii ce pare a fi îndreptată mai mult spre gruparea taxonilor decât spre separarea lor. Una din lucrările de bază privind sistematica levurilor este aceea editată de Kreger-van Rij, publicată în 1984. În acest volum, genul *Torulopsis* din trecut a fost transferat în genul *Candida*, iar unele specii *Saccharomyces* au fost transferate în genul *Torulaspora* şi *Zygosaccharomyces*. Starea teleomorfă sau perfectă a mai multor levuri face ca referirile din literatura mai veche să fie dificile.

Deak şi Beuchat, Beneke şi Stevenson, Pitt şi Hocking au prezentat o cheie simplificată de identificare a levurilor din alimente. Taxonomia a circa 15 genuri este prezentată rezumativ mai jos.

Diviziunea: *Ascomycotina*
Familia: *Saccharomycetaceae* (formează ascospori şi artrospori; reproducere vegetativă prin fisiune sau înmugurire)
Subfamilia: *Nadsonioideae*
Genul: *Hanseniaspora*
Subfamilia: *Saccharomycotoideae*
Genul: *Debaryomyces*
Issatchenkia
Kluyveromyces
Pichia
Saccharomyces
Torulaspora
Zygosaccharomyces
Subfamilia: *Schizosaccharoycetoideae*
Genul: *Schizosaccharomyces*
Diviziunea: *Deuteromycotina*
Familia: *Cryptococcaceae* (fungi imperfecți; reproducere prin înmugurire)
Genul: *Brettanomyces*
Candida
Cryptococcus
Rhodotorula
Trichosporon

Genurile de mai sus sunt enumerate în contiunare în ordine alfabetică:

1. *Brettanomyces* (stadiul perfect este *Dekkera*). Această levură este nesporogenă, cu celule ogivale şi înmugurire terminală, producând acid acetic din glucoză, numai în condiții aerobe. *B. intermedius* reprezintă specia tip şi poate creşte la un pH scăzut de 1,8. Aceste levuri produc alterarea berii, vinului şi băuturilor nealcoolice, a murăturilor, iar unele sunt implicate în postfermentarea unor beri blonde. *B. bruxellensis*

contribuie la formarea aminelor biogene din vinurile roşii.

2. *Candida*. Acest gen a fost creat în 1923 de către Berkhout şi a suferit o serie de modificări în ceea ce priveşte definiția şi clasificarea. Este considerat ca fiind un taxon heterogen important ce poate fi divizat în 40 de segmente cu 3 grupe principale, bazat în principal pe compoziția de acizi graşi şi cariotipizarea electroforetică. Numele generic înseamnă “alb strălucitor”, iar celulele nu conțin pigmenți carotenoizi. Speciile imperfecte de ascomicete sunt plasate aici, incluzând şi fostul gen *Torulopsis*, după cum urmează:

Candida famata (*Torulopsis candida, T. famata*);

Candida kefyr (*Candida pseudotropicalis, T. kefyr, Torula cremoris*);

Candida stellata (*Torulopsis stellata*);

Candida holmii (*Torulopsis holmii*).

Multe din formele anamorfe de Candida sunt azi incluse în genul *Kluyveromyces* şi *Pichia*. *Candida lipolytica* este anamorfa lui *Saccharomycopsis lipolytica*.

Membrii acestui gen sunt levurile cele mai frecvente din carnea de vită şi pui tocate recent, iar *C. tropicalis* reprezintă genul predominant din alimente. Unii membrii sunt implicați în fermentarea boabelor de cacao, ca o componentă a granulelor de kefir şi în multe alte produse incluzând unele tipuri de bere şi sucuri de fructe.

3. *Cryptococcus*. Reprezintă anamorfa genului *Filobasidiella* şi a altor basidiomicete. Sunt nesporogene, se reproduc prin înmugurire multilaterală şi nu fermentează zaharurile. Sunt hialine, de culoare roşie sau portocalie şi pot forma artrospori. Au fost găsite pe plante, soluri, căpşuni şi alte fructe, peşte marin, creveți şi carne de vită proaspătă, tocată.

4. *Debariomyces*. Levuri ascosporogene ce produc uneori un pseudomiceliu şi se reproduc prin înmugurire multilaterală. Ele sunt reprezentate de 2 genuri ce se găsesc în produsele lactate.

D. hansenii reprezintă ceea ce au fost în trecut *D. subglobosus* şi *Torulaspora hansenii*, fiind specia predominantă din alimente. Poate creşte în NaCl 24% şi la un a_w de numai 0,65. Creşte în saramură şi pe brânzeturi, provocând alterarea concentratului de suc de portocale şi a iaurtului.

5. *Hanseniaspora*. Sunt levuri apiculate ale căror anamorfe sunt speciile *Kloeckera*. Ele produc o înmugurire bipolară şi drept urmare se produc celule în formă de lămâie. Ascele conțin 2-4 spori în formă de pălărie. Fermentează zaharurile şi se găsesc pe tomate, smochine, căpşuni,

citrice şi intervin în fermentarea boabelor de cacao.

6. *Issatchenkia*. Membrii acestui gen produc pseudomiceliu şi se multiplică prin înmugurire multilaterală. Aici au fost incluse unele specii ce făceau parte din genul *Pichia*. Teleomorfa speciei *Candida krusei* este *I. orientalis* şi se găseşte în medii lichide unde formează pelicule caracteristice. Conține coenzima Q7, fiind frecvent întâlnită într-o mare diversitate în alimente.

7. *Kluyveromyces* (*Fabospora*). Sunt formatoare de ascospori, se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar sporii sunt sferici. *K. marxianus* include fostele specii *K. fragilis, K. lactis, K. bulgaricus, Saccharomyces lactis* şi *S. fragilis*.

K. marxianus este una din cele 2 levuri predominante din produsele lactate. Aceasta conține coenzima Q6, fiind implicată în fermentarea kumisului[6]. Este de asemenea folosită pentru producerea lactozei din zer. Se găseşte într-o largă diversitate de fructe şi produce alterarea brânzeturilor.

8. *Pichia*. Genul cel mai larg de levuri adevărate. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar ascele au de obicei 4 spori sferoidali în formă de pălărie sau saturniană. Pot forma pseudomicelii şi artrospori. Unii spori, în formă de pălărie aparțin speciilor *Williopsis*, iar unele din speciile mai vechi sunt acum clasificate în genul *Debaryomyces*.

P. guilliermondii este starea perfectă a speciei *Candida guilliermondii*. Anamorfa speciei *P. membranaefaciens* este *Candida valida*. Speciile lui *Pichia* formează în mod caracteristic pelicule pe mediile lichide şi sunt importante în producerea unor alimente indigene în diferite părți ale lumii.

Unele au fost găsite pe peştele proaspăt şi pe creveți şi cresc frecvent în saramura de măsline şi alterează murăturile şi varza murată.

9. *Rhodotorula*. Aceste levuri sunt anamorfe ale familiei *Basidiomycetes*. Cele care produc teleospori sunt incluse în genul *Rhodosporidium*. Se reproduc prin înmugurire multilaterală şi sunt nefermentativi.

R. glutinis şi *R. mucilaginosa* sunt speciile prevalente din alimente. Ele produc pigmenți roz până la roşu, majoritatea fiind de culoare portocalie sau roz. Se găsesc pe carnea proaspătă de pui, crevete, peşte şi vită şi unele cresc pe suprafața untului.

10. *Saccharomyces*. Aceste levuri ascosporogene se multiplică prin înmugurire multilaterală şi produc spori sferici în asce. Sunt diploizi şi nu fermentează lactoza. Cele clasificate în trecut ca speciile *S. bisporus* şi *S. rouxii* sunt acum incluse în genul *Zygosaccharomyces*, iar specia *S.*

[6] băutură fermentată din lapte de iapă

rosei este clasificată în prezent în genul *Torulaspora*. Toate levurile din bere, pâine, vin, şampanie sunt incluse în specia *S. cerevisiae*. Ele se găsesc în granulele de kefir putând fi izolate dintr-o gamă largă de alimente: salam uscat şi fructe. *S. cerevisiae* produce rar alterări ale alimentelor.

11. *Schizosaccharomyces*. Se divid prin fisiune laterală sau prin formarea de pereți transversali şi pot produce hife adevărate şi artrospori. Ascele conțin 4-8 spori în formă de boabe şi nu produc muguri. Sunt considerate ca fiind rudele îndepărtate ale levurilor adevărate. *S. pombe* este specia tip. Este osmofilă şi rezistentă la unii conservanți chimici.

12. *Torulaspora*. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, cu formare de spori sferici cu asce. Trei specii haploide incluse în trecut în genul *Saccharomyces* sunt azi incluse în acest gen. Ele sunt agenți puternici de fermentare a zaharurilor şi conțin coenzima Q6. *T. delbrueckii* este specia cea mai prevalentă în alimente.

13. *Trichosporon*. Aceste levuri oxidative neformatoare de ascospori se multiplică prin înmugurire şi prin formarea de artroconidii. Produc micelii adevărate, iar fermentarea zaharurilor este absentă sau slabă. Sunt implicate în fermentațiile boabelor de cacao şi idli şi au fost identificate în crevetele proaspăt, carnea de vită, pui, miel congelat şi alte alimente.

14. *Yarrowia*. În trecut aparțineau genului *Saccharomycopsis*. Fac parte din ordinul Endomycetales şi apar frecvent pe fructe, legume, carnea de vită şi pui. *Candida lipolytica* reprezintă stadiul amamorf, iar *Y. lipolytica* este stadiul teleomorf (perfect).

15. *Zygosaccharomyces*. Se reproduc prin înmugurire multilaterală, iar ascosporii în formă de boabe sunt în general liberi în asce. Majoritatea sunt haploide fiind agenți de fermentare puternici ai zaharurilor.

Z. rouxii este specia tip şi poate creşte la un a_w de 0,62, după *Xeromyces bisporus* cunoscut pentru abilitatea sa de a creşte la un a_w scăzut.

Unele specii sunt implicate în fermentarea shoyu şi miso, iar altele sunt agenți obişnuiți de alterare ai maionezei şi garniturilor de salată, în special *Z. bailii*, care poate creşte la un pH de 1,8.

8.3. Particularități morfologice şi taxonomice

Prin caracterele microscopice şi ale coloniilor formate ciupercile microscopice se diferențiază în:

- levuri;
- fungi filamentoşi;

• fungi dimorfi.

Levurile au celulele ovale sau sferice, înmugurite, şi formează colonii rotunde, bombate, lucioase, cremoase, fiind asemănătoare cu bacteriile.

Fungii filamentoşi (mucegaiurile) formează hife (filamente ramificate septate sau neseptate) întrețesute într-un miceliu care are două părți:

• miceliul vegetativ, cu creştere submersă în mediul de cultură de unde absoarbe nutrienții;

• miceliul aerian care creşte erect la suprafața mediului şi formează organele de fructificare care sunt formatoare de spori (conidii).

Fungii dimorfi cresc ca levuri în țesuturile gazdei sau în culturi la temperatura de 37°C şi au o creştere miceliană în culturi la 22-30°C sau în sol.

După aspectul microscopic al hifelor, se deosebesc următoarele forme de fungi:

• fungi cu hife hialine, neseptate, groase, răsucite formate de zigomicete;

• fungi cu hife hialine septate şi nepigmentate, cu variate şi numeroase organe de fructificare (uneori apar pigmentate);

• fungi dematiacei, cu hife septate şi pigmentate în brun.

8.4. Forme de multiplicare ale ciupercilor microscopice

Înmulțirea fungilor se realizează:

• sexuat, forma teleomorfă, fungii perfecți;

• asexuat (vegetativ), fungii imperfecți.

Înmulțirea sexuată se produce prin fuziunea a două celule, gameții, care dau naştere unei formațiuni în care, după meioză, apar sporii:

• zigospori;

• ascospori;

• bazidiospori.

Clasificarea naturală a fungilor se realizează după înmulțirea sexuată astfel:

• clasa *Zigomycetes*;

• clasa *Ascomycetes*;

• clasa *Basidiomycetes*;

• clasa *Deuteromycetes*.

Înmulțirea vegetativă se face prin sporangiospori la zigomicete şi prin conidii la celelalte clase.

• sporangiosporii se formează în organele de fructificare numite sporangii, care au aspect de săculeț şi sunt purtate de sporangiofori,

segmente diferențiate ale miceliului aerian.

• conidiile sunt formate de levuri sau sunt purtate la extremitatea unor conidiofori diferențiați din miceliul aerian.

Conidiile formate de levuri sunt reprezentate de:

• blastoconidii, care apar prin înmugurire la levuri sau la unii fungi şi poartă „cicatrice” bazale la locul desprinderii de celula mamă (de exemplu: *Cladosporium*);

• chlamidoconidiile apar prin creşterea şi rotunjirea unor celule de la extremitatea hifelor (terminate) sau intercalare (sesile) (de exemplu: *Candida albicans*);

• artroconidiile se formează din celulele hifale care cresc şi îşi îngroaşă peretele (*Geotrichum*).

Conidioforii sunt segmente hifale specializate la extremitatea cărora se formează conidiile. Acestea pot fi mici şi unicelulare (microconidii) sau mari şi multicelulare (macroconidii) purtate de conidiofori bine diferențiați.

La unii fungi extremitatea conidioforilor este ramificată în segmente secundare numite fialide sau anelide.

Fialidele produc la apexul lor conidii acropetale (*Penicillium*).

Anelidele sunt celule conidiogene care prin creştere şi strangulare, formează un lanț de conidii în secvență baziseptală (*Scopulariopsis*).

8.5. Caracteristicile levurilor şi mucegaiurilor

Aceste microorganisme sunt eucariote. Toate levurile şi mucegaiurile sunt heterotrofe, fiind lipsite de clorofilă, dependente de o sursă externă, pentru a-şi acoperi nevoile energetice.

Unitatea structurală de bază se numeşte *hifă*, iar totalitatea hifelor alcătuiesc *miceliul*.

Trebuie menționat că majoritatea levurilor şi mucegaiurilor din alimente nu au un stadiu sexual.

Creşterea acestor microorganisme depinde de mai mulți factori de mediu şi anume:

• temperatura – majoritatea levurilor şi mucegaiurilor din alimente sunt mezofile (20-28°C), dar există şi specii psihrofile (se pot dezvolta până la -2°C) sau termofile (până la 60°C).

Există, de asemenea, un număr de specii termotolerante şi psihrotolerante, care sunt capabile să supraviețuiască, dar nu să se şi multiplice la temperaturi excesive.

• umiditatea – majoritatea levurilor şi mucegaiurilor pot creşte pe substraturi ce generează o umiditate relativă de 85% sau chiar mai mult.

Unele mucegaiuri, în special cele depozitate, pot creşte la umidități

relativ reduse (60-70%). Tot astfel unele specii de levuri se pot multiplica în condiţii de umiditate redusă, în substraturi cu 50-60% glucoză.

• pH-ul – limitele pH-ului pentru iniţierea creşterii sunt cuprinse între 2 până la peste 9. În absenţa unui tampon puternic, majoritatea acestor organisme pot modifica pH-ul într-unul care este mai favorabil pentru creşterea lor, de obicei la o valoare între 4 şi 6,5.

• oxigenul – toate speciile de mucegaiuri sunt obligat aerobe, totuşi unele specii au capacitatea să se dezvolte deasupra alimentelor din conserve sau într-o atmosferă lipsită de oxigen prin procurarea acestuia de la substratul însuşi.

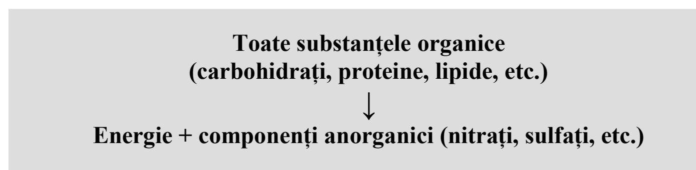
****

Principiile biologice şi rolurile biotipurilor microbiene asociate atât regnului animal cât şi celui vegetal în habitatele naturale sunt elemente importante a căror înţelegere rămâne o prioritate atâta timp cât acestea vor fi considerate alimente.

În concepţia curentă a ceea ce înseamnă viaţă funcţia principală a microorganismelor din natură este autoperpetuarea. De-a lungul acestui proces heterotrofele şi autotrofele efectuează următoarea reacţie generală:

Fig. 8.1.

Reacţia generală a heterotrofelor şi autotrofelor



Aceasta, desigur, nu reprezintă, în esenţă, nimic mai mult decât operarea (funcţionarea) ciclului azotului şi a ciclului altor elemente. Alterarea microbiologică a alimentelor poate fi privită simplist ca o încercare a biotipurilor alimentare de a îndeplini ceea ce pare să fie rolul lor principal în natură. În ciuda structurii lor simple microorganismele au capacitatea de a efectua multe reacţii chimice complexe, esenţiale pentru perpetuarea lor. Aceste reacţii chimice solicită o serie de nutrienţi organici, unii dintre aceştia fiind similari cu cei ce reprezintă aportul nutritiv uman. Dacă se iau în considerare tipurile de organsime asociate cu alimentele vegetale şi animale în stare lor naturală, se pot prevedea tipurile generale de microorganisme ce se aşteaptă a fi izolate în produsele alimentare provenind din acestea, în diferitele faze de procesare ulterioară. Rezultatele obţinute în mai multe laboratoare arată că este de aşteptat ca

alimentele netratate să conțină un număr diferit de bacterii, mucegaiuri, levuri şi, deseori, se pune întrebarea inocuității unui anumit aliment pe baza numărului total de germeni. Întrebările care se pun interesează numărul total de organsime prezente pe gram sau mililitru şi respectiv tipurile de microorganisme prezente în acest număr.

Este necesară cunoaşterea microorganismelor asociate în mod normal cu un anumit aliment ca produs neprelucrat şi cea a microorganismelor ce nu sunt normale pentru acel aliment. De aceea este importantă cunoaşterea distribuției generale a microorganismelor în natură şi tipurile de organisme prezente în mod normal, în condițiile în care alimentele se găsesc şi sunt manipulate.

Capitolul 9
Virusuri cu importanță în microbiologia alimentelor

Infecțiile virale cu impact negativ asupra produselor alimentare de origine animală sunt sistematizate în două grupe mari:

- viroze transmisibile la om pe cale naturală prin carne sau organe;
- viroze netransmisibile la om prin carne şi organe, dar care pot deprecia calitatea acestora.

Sistematizate sub cele mai variate forme, virusurile transmisibile prin hrană rămân o cauză obişnuită, dar probabil nerecunoscută a gastroenteritelor şi pot sta, adesea, la originea unor episoade de îmbolnăvire. Infecția umană poate fi rezultatul consumului de alimente contaminate sau al transmiterii de la o persoană la alta prin contact direct sau prin aerosoli. Alimentele pot fi contaminate de către persoanele ce o manipulează, dacă sunt infectate, sau în urma contactului cu apa sau alte reziduuri contaminate. Cele mai frecvente focare de boală cu etiologie virală declarate au fost asociate cu consumul de crustacee care au fost colectate din vecinătatea deversărilor de ape menajere contaminate. Deşi difuzarea bolilor virale prin alimente este greu de demonstrat, se pare că cel mai mare risc al transmiterii lor se întâlneşte în catering, unde operațiunile de preparare a alimentelor neprelucrate termic sunt numeroase.

Virusurile transmisibile prin alimente mai pot fi sistematizate şi în alte două grupe principale:

- Virusuri Norwalk-like (NVL, cunoscute şi sub denumirea de virusuri mici rotunde sau SRSV) care determină gastroenterite;
- Virusul hepatitei A, care produce hepatită.

Alte tipuri de virusuri care pot fi ocazional implicate în îmbolnăviri sunt astrovirusurile şi rotavirusurile, dar transmiterea acestora prin alimente este rară.

Pentru a se replica virusurile solicită o gazdă, iar sursa de origine a tuturor virusurilor transmisibile prin alimente este reprezentată de intestinul uman. Ele nu se pot replica în alimente. Contaminarea alimentelor poate avea loc pe parcursul preparării şi servirii lor de către personalul contaminat sau prin contactul cu reziduurile menajere sau apa contaminate. Cel mai adesea aceste infecții virale sunt asociate produselor culinare preparate din diferite tipuri de moluşte bivalve (midii sau scoici comestibile) recoltate de pe plaje contaminate cu gunoaie sau din apropierea gurilor de evacuare a apelor menajere în mare sau ocean. Ariile de colectare a crustaceelor sunt clasificate pe baza nivelului de contaminare a crustaceelor cu bacterii prezente în fecale. Dacă nivelul de

contaminare depăşeşte limitele legale pentru a fi consumate direct atunci, pentru a putea fi comercializate, crustaceele trebuie reimersate în apă curată, supuse unui tratament termic corespunzător sau supuse unui proces de purificare (epurare). Aceste crustacee sunt adevărate filtre marine ce pot concentra cantități mari de virus din mediul acvatic înconjurător. Moluştele sunt consumate fie în stare crudă fie după o prelucrare termică uşoară, ce nu poate inactiva în totalitate particulele virale prezente. În plus purificarea nu poate garanta înlăturarea virusurilor, iar episoade de gastroenterite virale au fost atribuite crustaceelor supuse unui asemenea tratament. Cultivarea moluştelor bivalve în apă curată este deci cea mai bună modalitate de control a infecțiilor virale. Deci, deşi moluştele sunt în mod evident considerate o sursă de infecție în cazul bolilor virale transmisibile prin alimente, ele nu sunt cea mai importantă cauză a îmbolnăvirilor.

Legumele şi fructele pot fi surse secundare de infecție, constituind un suport de vehiculare a virusurilor patogene pentru om atunci când au fost fertilizate sau irigate cu gunoaie menajere ori apă contaminate. De altfel, în ghidurile publicate de WHO (Organizația Mondială a Sănătății) se statuează că acele fructe şi legume care se consumă crude nu trebuie fertilizate cu gunoaie menajere sau irigate cu apă contaminată. O parte din cazurile de hepatită A sunt rezultatul contaminării prin fructe.

Consumul apei şi gheții contaminate sau utilizarea acestora la prepararea mâncării poate fi de asemenea o altă cauză a infecțiilor virale.

Contaminarea mâncării de către operatori este probabil cea mai comună cauză a bolilor virale transmise prin alimente. Anumite sortimente de mâncare, cum ar fi salatele sau platourile de desert, solicită o manipulare manuală considerabilă în timpul pregătirii şi nu sunt supuse unor tratamente termice înainte de a fi consumate, motiv pentru care sunt frecvent implicate în îmbolnăvirile virale transmise prin alimente.

În practica uzuală de laborator nu este posibilă detecția virusurilor din hrană deoarece acestea au nevoie de o gazdă vie pentru a se replica. În plus, nivelul particulelor virale în hrana contaminată este uzual foarte redus. Există laboratoare de specialitate capabile să utilizeze culturile celulare şi alte metode complexe de extragere şi identificare a virusurilor, dar aceste metode nu pot fi implementate în laboratoarele uzinale ce apelează la metode uzuale şi expeditive de diagnostic.

Utilizarea tehnicii PCR (Polymerase Chain Reaction) în detecția NLV din alimentele implicate în focare de boală a fost deja dezvoltată, dar este încă în faza de perfecționare întrucât nu este încă posibilă detectarea tuturor tulpinilor virale.

Metoda curentă de detecție a NLV din fecale este microscopia electronică (ME). Pentru a fi posibilă identificarea este necesară o

concentrație de cel puțin un milion particule virale per gram de fecale şi numai probele de fecale obținute în primele 48 de ore de la debutul bolii se pretează la examinarea pentru NLV. Tehnica PCR de identificare a NDV din fecale şi vomă este mult mai sensibilă decât ME, putându-se utiliza probe prelevate şi la 7 zile de la debutul simptomatologiei.

Identificarea virusului hepatitei A din fecale prin ME uzual nu este posibilă deoarece apariția icterului este cu mult după ce peak-ul excreției particulelor virale a trecut, motiv pentru care diagnosticul se bazează pe identificarea restructurărilor imunologice ale organismului afectat (identificare IgM, IgG) din serul sanguin sau salivă.

Virusurile transmisibile prin alimente sunt rezistente şi pot supraviețui perioade lungi de timp în alimente sau în mediul unde se manipulează alimentele. Acestea sunt foarte rezistente la congelare, refrigerare, conservanți şi radiații ionizante. Virusul hepatitei A este distrus rapid prin încălzire la peste 85°C şi la fel ca NLV este inactivat la această temperatură. Inactivarea virusurilor are loc la temperaturi de peste 60°C la o rată proporțională cu temperatura, dar şi cu a compoziției mediului în care se găsesc aceste virusuri. Acestea supraviețuiesc la pH-ul acid (pH 3), găsindu-se în fructele acide cum sunt căpşunile şi zmeura şi în unele procese cum sunt murarea în oțet sau obținerea iaurtului. Aceste virusuri sunt rezistente şi la alcool şi concentrații ridicate de zahăr.

Persoanele implicate în manipularea sau prepararea produselor alimentare cu manifestări gastroenterice exprimate prin vomă sau diaree trebuie excluse obligatoriu de la aceste activități. Ele nu trebuie să revină la muncă mai devreme de 2 zile de la data remiterii semnelor clinice. Contaminarea alimentelor cu NLV de către aceste persoane se realizează foarte uşor datorită cantității foarte mari de particule virale prezente în fecalele şi voma de la debutul simptomatologiei şi a rezistenței crescute în mediul înconjurător. Infectarea personalului se poate realiza şi prin inhalarea de aerosoli, nu doar prin ingestie. O cale frecventă de transmitere este aceea a „mâinilor murdare”, de aceea echipamentele de igienizare a mâinilor nu trebuie să lipsească din grupurile sanitare ale unităților din industria alimentară. Dacă vomitarea s-a produs în bucătărie sau pe linia de producție a unei unități alimentare trebuie implementat un program strict de decontaminare virală a mediului. Cea mai bună metodă este utilizarea apei calde cu detergent urmată de o dezinfecție cu un produs pe bază de clor la o concentrație de 500 ppm clor activ. Alimentele care au fost expuse la contaminarea prin aerosoli sau care au fost manipulate de persoana bolnavă trebuie distruse în timpul cel mai scurt dacă nu este posibilă tratarea lor la o temperatură medie de cel puțin 85°C după expunere.

Pentru a preveni transmiterea virusurilor gastroenterice prin

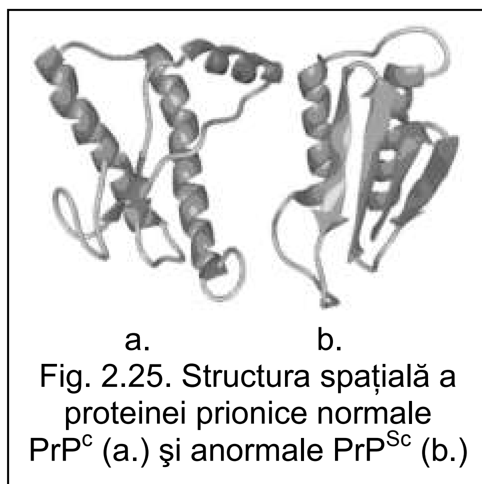
crustacee acestea se recomandă a fi cultivate în apă curată deoarece procesul de epurare nu constituie metoda cea mai sigură de eliminare a virusurilor. Pentru a distruge virusurile din moluşte tratamentul termic al acestora trebuie să garanteze atingerea unei valori de temperatură în interiorul cochiliei de 85 – 90°C pentru o perioadă de cel puțin 90 de secunde, dar este necesar un control strict al procesului de manipulare pe fluxul tehnologic (evitarea încrucişării timpilor operatori) şi evitarea manipulării cărnii cu mâna. Consumarea de moluşte crude cum ar fi midiile rămâne un risc, la fel ca şi cel al contaminării încrucişate în bucătărie de la crustacee la alte alimente.

Contaminarea alimentelor, altele decât crustaceele, se întâlneşte de obicei la suprafața acestora, iar la acest nivel virusurile se distrug uşor prin tratament termic. Procesarea termică uzual practicată în industria alimentară presupune încălzirea la o temperatură medie de 70°C timp de 2 minute. Aceasta reduce substanțial nivelul contaminării virale, dar nu distruge toate virusurile dacă nivelul contaminării a fost foarte ridicat.

Prevenirea îmbolnăvirilor virale prin intermediul alimentelor depinde în mare măsură de educarea personalului şi de nivelul de conştientizare a acestui risc în industria alimentară.

Capitolul 10
Prionii şi importanța lor în microbiologia alimentelor

Prionii (En. *Proteinaceus infectious particles* = particule proteice infecțioase) sunt definite ca izoforma patologică a unei structuri proteice normale codificate de organismele gazdă. Noțiunea de prion a fost folosită prima oară de Prusiner, cel care a studiat pe larg această infecție la ovine (scrapia). Aceste entități infecțioase au cunoscut de-a lungul timpului numeroase denumiri, cum sunt „viroze neconvenționale”, „viroze lente”, „amiloidoze transmisibile” sau „encefalopatii spongiforme subacute”. În medicina actuală bolile produse de aceste entități infecțioase neconvenționale sunt cunoscute ca encefalopatii spongiforme transmisibile (EST), iar conceptul de prion rămâne o problemă controversată, întrucât aceştia nu au acizi nucleici (entități infecțioase lipsite de ADN sau ARN). Declanşarea EST constă în conversia unei proteine existentă normal în țesutul nervos al mamiferelor - PrP^c - într-o proteină mutantă - PrP^{Sc} - responsabilă de exprimarea clinico-lezională a bolii. În urma contactului cu prionii exogeni, proteina PrP^c se transformă în copii infecțioase ce vor fi depozitate la suprafața celulei, sub formă de plăci amiloide, sau intracelular, sub formă de fibrile prionice. PrP^c şi PrP^{Sc} au aceeaşi secvență de aminoacizi, dar structura spațială diferită, proteina normală având mai multe regiuni α-helix, iar cea infecțioasă mai multe regiuni β-helix pliate.


a. b.
Fig. 2.25. Structura spațială a proteinei prionice normale PrP^c (a.) şi anormale PrP^{Sc} (b.)

Teoria naturii proteice a prionilor este susținută şi de efectul sau lipsa efectului unor substanțe asupra acestora. Prionii nu sunt distruşi de o serie de substanțe chimice sau metode tratamente fizice cunoscute ca degradante pentru acizii deoxiribo- şi ribonuceici.

Deşi foarte rare, noua formă a bolii Creutzfeld-Jakob (NVCJD), sindromul Alpers, boala Kuru şi alte EST umane rămân boli incurabile. Numeroasele necunoscute etiologice şi patogenetice au ridicat mari semne de întrebare referitoare la transmiterea infecțiilor prionice de la animale la om prin alimente sau produse biotehnologice. Pentru microbiologia alimentară prezintă un interes special prionii rumegătoarelor. Cu toate că nu există

dovezi ale transmiterii scrapiei (EST ovină) la om, în legislația Uniunii Europene se stipulează că splina rumegătoarelor mici (oi, capre) provenind la indivizi de orice vârstă şi capul (inclusiv creierul, globii oculari, amigdalele) şi măduva spinării provenind de la animalele mai mari de un an constituie materiale cu risc EST, acestea fiind excluse din alimentația publică şi din furajarea animalelor, fiind distruse. Față de encefalopatia spongiformă bovină măsurile de prevenire a transmiterii prionilor de la bovine la om au fost luate în Marea Britanie încă din 1988 şi ulterior au fost reglementate şi de Uniunea Europeană şi Organizația Mondială a Sănătății Animale. Interzicerea folosiri în alimentația umană a unor organe provenind de la bovine sănătoase a fost instituită în Marea Britanie înainte de a fi semnalate primele cazuri de NVCJD. La bovinele din Marea Britanie şi alte state cu incidență ridicată, aceste organe definite ca „materiale cu risc specific" sunt, la fel ca şi la ovine, reprezentate de capul în totalitate, ce conține creierul, globii oculari, ganglionii trigemeni, amigdalele, dar fără limbă (considerată organ separat), măduva spinării, amigdale, timus, splină, masa intestinală, de la bovinele mai mari de 6 luni. La bovinelor cu vârsta mai mare de 30 luni se confiscă şi ganglionii rădăcinilor dorsale ale nervilor rahidieni. Se consideră că NVCJD a fost contactată prin consumul cărnii şi al produselor din carne provenite de la vaci cu ESB.

Capitolul 11
Principalele caractere diferențiale între bacterii, virusuri şi ciuperci microscopice

Tabelul 11.1

Caracterul diferențial	**Virusuri**	**Bacterii**	**Ciuperci microscopice**
Numarul tipurilor de acid nucleic	1	2	3
Tipul de organizare	acelular	procariot	eucariot
Organizarea materialului genetic	genom viral	un singur cromozom şi plasmide	mai mulți cromozomi
Echipament enzimatic şi activitatea metabolica proprie	absente	prezente	prezente
Capacitatea de creştere	absentă	prezentă	prezentă
Mod de reproducere	sunt sintetizate de celula gazdă	independent, mai ales prin sciziparitate	independent, prin forme variate asexuate şi sexuate
Capacitatea de diferențiere celulară	nu este cazul	absentă	prezentă
Parazitism absolut	constant, obligatoriu	absent	absent
Forme biologice de existență în natură	- virion infecțios (temporar extracelular) - virus vegetativ intracelular în curs de sinteză - virus integrat fixat în cromozomul celulei gazdă)	- celula vegetativă (capabilă de diviziune) - spor (forma de conservare)	- miceliu sau pseudomiceliu (tal) - spor (forma de reproducere)
Poziția pe scara filogenetică	la granița între viu şi neviu	organisme vii cu organizare simplă (protiste)	organisme vii cu diverse grade de complexitate morfofiziologică

Capitolul 12
Sursele principale de microorganisme prezente în alimente şi controlul lor

12.1. Solul şi apa

Apa este una din cele mai abundente substanțe de pe pământ şi joacă un rol crucial în ciclul vieții. În fapt viața pe Terra îşi are originea în apă, tot ceea ce este viu are nevoie de apă, iar numeroşi oameni de ştiință consideră că viața ar fi imposibilă fără apă. Totuşi, apa reprezintă 60 până la 90% din compoziția chimică a unui organism, restul fiind ocupat de alte elemente reunite în molecule de complexitate variabilă în care prezenta carbonului este uzuală, element ce se poate combina cu alți atomi în cele mai variate feluri. Cel mai evident efect al microorgansimelor de pe pământ este abilitatea lor de a recicla elementele primare existente în toate ecosistemele din natură, în principal carbonul, oxigenul şi azotul. Aceste elemente şi moleculele care le conțin trebuie puse la dispoziția tuturor formelor de viață existente şi ele se regăsesc deopotrivă în sol şi apă, în concentrații din cele mai variate, permițând organismelor să şi le extragă în funcție de necesitățile lor.

Sub raport microbiologic cele două componente ale mediului înconjurător sunt analizate împreună deoarece multe bacterii şi fungi din sol şi apă au foarte multe elemente în comun. Microoganismele prezente în sol pot fi dispersate în atmosferă de către curenții de aer, cel mai adesea purtați de particule fine de praf, iar ulterior aceştia ajung în picăturile fine de apă care, prin căderea sub forma picăturilor de ploaie, reajung în sol sau în apă de suprafață. Această evoluție ciclică este constantă atât la microorganismele din sol cât şi la cele acvatice, care sunt în mare masură identice. Totuşi, persistența în sol a unor organisme acvatice nu este posibilă, şi în această grupă sunt incluse preponderent cele existente în apele marine. Speciile *Alteromonas* sunt forme acvatice ce au nevoie de salinitatea apei de mare pentru a creşte şi persistența acestora în sol este în mai mică măsură aşteptată. Microflora bacteriană din apa de mare este în esență Gram negativă, bacteriile Gram pozitive fiind pasagere. Apa contaminată a fost implicată în infecțiile cu *Cyclospora* ale smeurei proaspete.

Importanța apei şi a calității acesteia pentru industria alimentară este majoră. Astfel, dacă se ia în discuție prima fază a procesului de obținere a produselor de origine animală, respectiv unitățile de abatorizare, reducerea presiunii infecțioase create prin depunerea microorgansimelor

pe suprafața carcaselor nou obținute presupune curățarea de cheaguri de sânge sau impurități mecanice, fasonarea carcasei (înlăturarea suprafețelor anfractuoase unde se pot dezvolta microorganisme) şi spălarea cu jet de apă sub presiune. Utilizarea echipamentelor corespunzătoare (perii-duş speciale din cauciuc) şi a procedurilor de curățare optime (jet de apă sub presiune aplicat oblic) asigură reducerea cu peste 90% a numărul total de germeni de pe suprafața carcasei. Utilizarea apei sub presiune asigură o îmbibare mai redusă a carcasei cu apă decât la spălarea cu furtunul, pelicula uscată de la suprafața acesteia realizându-se mai repede. Este interzisă spălarea carcasei sau a subproduselor comestibile în bazine din care apa nu se scurge continuu. După 4-6 ore de zvântare la rece (10^oC) la suprafața carcaselor se formează o peliculă uscată ce va preveni contaminările ulterioare.

Pentru aprovizionarea cu apă a obiectivelor din domeniul alimentar trebuie să existe o sursă de apă potabilă, care se utilizează ori de câte ori se impune evitarea contaminării alimentelor. Apa curată poate fi utilizată pentru produsele din pescuit întregi sau pentru alte tipuri de spălare externă. Apă de mare curată poate fi utilizată pentru moluşte bivalve vii, echinoderme, tunicate şi gasteropode marine.

Atunci când în unitățile alimentare este utilizată apa nepotabilă, pentru incendii, producerea de aburi, refrigerare sau alte scopuri similare, aceasta trebuie circulată printr-un sistem separat, bine identificat. Apa nepotabilă nu trebuie să aibă conexiuni cu sau să permită refluxul în sistemele de apă potabilă. Apa reciclată utilizată pentru prelucrare sau ca ingredient nu trebuie să prezinte nici un risc de contaminare. Aceasta trebuie să fie de acelaşi standard ca apa potabilă. Gheața ce vine în contact cu alimentele sau care poate contamina alimentele trebuie să fie produsă din apă potabilă sau, atunci când este utilizată pentru răcirea produselor din pescuit întregi, din apă curată. Aceasta trebuie să fie produsă, manipulată şi depozitată în condiții care să o protejeze de contaminare. Aburul utilizat în contact direct cu alimentele nu trebuie să conțină nici o substanță ce reprezintă un pericol pentru sănătate sau care are potențialul să contamineze alimentele.

Atunci când alimentelor le este aplicat un tratament termic în containere sigilate ermetic, trebuie să se asigure ca apa utilizată pentru răcirea containerelor după tratamentul termic să nu constituie o sursă de contaminare pentru alimente.

12.2. Plantele şi produsele vegetale

Se poate presupune că majoritatea microorganismelor din sol şi apă sunt capabile să contamineze plantele. Totuşi, numai un număr relativ

mic găsesc aici mediul adecvat bunăstării lor generale. Cele care persistă pe produsele vegetale datorează aceasta capacității lor de a adera la suprafața plantelor, astfel încât să nu se îndeparteze uşor prin spălare, precum şi faptului că sunt capabile să beneficieze de cerințele lor nutriționale. Dintre acestea trebuie menționate bacteriile acidolactice şi unele levuri. Bacteriile patogene pentru plante fac parte din genurile *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* şi *Xanthomonas*. Agenții patogeni fungici se găsesc printre diferite genuri de mucegaiuri.

Invariabil microbii se asociază benefic, uneori esențial, cu toate formele de organisme superioare din care nu sunt excluse plantele. În lumea plantelor, leguminoasele (mazărea, fasolea, lucerna) trăiesc în strânsă asociere cu bacterii care extrag azotul din atmosferă şi ajută plantele să crească.

Operatorii cu activitate în domeniul alimentar care produc sau recoltează produse vegetale trebuie să mențină curate şi să dezinfecteze facilitățile, echipamentul, containerele, lăzile, vehiculele şi vasele. Aceştia trebuie să asigure condiții igienice de producție, transport şi depozitare a produselor vegetale. Pentru a preveni contaminarea plantelor şi produselor vegetale trebuie utilizată numai apă potabilă sau apă curată, trebuie evitat contactul acestora cu animalele sau alți dăunători, iar personalul care manipulează asemenea produse alimentare să fie sănătos şi instruit cu privire la riscurile pentru sănătatea publică. Depozitarea şi manipularea deşeurilor şi substanțelor periculoase trebuie făcută de o manieră care să prevină contaminarea produselor vegetale. De asemenea operatorii cu activitate în dimeniul alimentar care produc sau recoltează produse vegetale trebuie să țină cont de rezultatele oricăror analize relevante efectuate pe probe prelevate de la plante sau pe alte probe ce au importanță pentru sănătatea publică şi să utilizeze corect produsele pentru protecția plantelor şi biocidele.

12.3. Materialele de manipulare a alimentelor

Toate articolele, ustensilele, dotările, garniturile, componentele şi echipamentele cu care alimentele vin în contact trebuie igienizate eficient, iar atunci când este necesar, dezinfectate. Igienizarea şi dezinfecția trebuie să aibă loc cu o frecvență suficientă pentru a se evita orice risc de contaminare. Aceste materiale trebuie construite şi confecționate din materiale care să reducă la minimum orice risc de contaminare şi să permită curățarea, iar atunci când este necesar şi decontaminarea. Acestea se instalează de o manieră care să permită igienizarea adecvată a echipamentului şi zonei înconjurătoare.

Atunci când se recoltează legumele cu ajutorul ustensilor de recoltare, microorganismele de suprafaţă contaminează suprafeţele de contact. De asemenea secţionarea unui bloc de carne într-o piaţă împreună cu folosirea de cuţite şi maşini de tocat provoacă un nivel aproape constant de contaminare cu microorganisme prin acumularea unui număr din ce în ce mai mare de bacterii.

Prevenirea contaminării alimentelor de către ustensilele cu care sunt manipulate presupune instituirea unui program de igienizare a spaţiilor, cu identificarea punctelor critice de control unde contaminarea sau dezvoltarea microorganismelor ar fi posibilă.

Evitarea contaminării carcaselor prin intermediul cuţitelor, masatelor sau fierăstraielor utilizate de măcelari la tranşare se realizează cu ajutorul sterilizatoarelor cu apă încălzită la circa 85-90^{o}C. Prezenţa acestor sterilizatoare în punctele de lucru este obligatorie, iar utilizarea acestora se face după tranşarea fiecărui animal sau ori de câte ori este nevoie.

Pentru ca alimentele să fie protejate împotriva contaminării mijloacele de transport şi/sau containerele utilizate pentru transportul acestora trebuie să fie menţinute curate şi în stare bună de întreţinere şi funcţionare şi, după caz, să fie concepute şi construite astfel încât igienizarea şi dezinfecţia să fie posibilă. Recipientele destinate produselor alimentare nu ar trebui utilizate pentru transportul produselor non-alimentare. Atunci când acestea sunt utilizate şi pentru transportul altor materiale decât produse alimentare sau pentru transportul simultan al unor produse alimentare diferite, trebuie să existe o separare efectivă a produselor.

Materialul utilizat pentru ambalare şi împachetare nu trebuie să reprezinte o sursă de contaminare, acestea depozitându-se de aşa manieră încât acestea să nu fie expuse la un risc de contaminare. Ambalarea şi împachetarea trebuie efectuate într-o manieră care evită contaminarea produselor alimentare. După caz şi în special în cazul recipientelor şi al vaselor de sticlă, trebuie să fie asigurate integritatea containerului şi igiena acestuia. Materialul de ambalare şi de împachetare reutilizat pentru produse alimentare trebuie să fie uşor de igienizat şi dezinfectat.

Produsele alimentare în stare lichidă, granulate sau sub formă de pudră, în vrac, trebuie transportate în recipiente, containere sau tancuri destinate exclusiv acestora. De aceea aceste containere se marchează în mod vizibil cu litere ce nu pot fi şterse, în una sau mai multe limbi de circulaţie internaţională, pentru a se scoate în evidenţă că acestea sunt utilizate exclusiv pentru transportul de produse alimentare, sau trebuie să fie marcate cu inscripţia „numai pentru produse alimentare”. Dacă mijloacele de transport (containerele) au fost utilizate la transportul

produselor non-alimentare sau al altor sortimente alimentare este obligatorie igienizarea prealabilă pentru a se evita contaminarea încrucişată.

În vederea evitării deprecierii produselor alimentare perisabile, mijloacele de transport sau containerele de transport trebuie dotate cu echipamente de menținere a alimentelor la temperaturi corespunzătoare şi să permită monitorizarea acestei temperaturi.

12.4. Manipulatorii alimentelor

Microorganismele de pe mâinile şi îmbrăcămintea manipulatorilor de alimente reflectă mediul şi deprinderile indivizilor, iar organismele respective pot fi cele din sol, apă, praf şi alte surse de mediu. Alte surse la fel de importante sunt cele din cavitățile nazale, gură, piele şi din tractul gastrointestinal. Pe fondul deficiențelor de igienă personală, din toate sursele amintite mai sus pot pătrunde în alimente agenți microbieni potențial patogeni sau patogeni. Din acest motiv legislația actuală impune ca personalul ce manipulează produse alimentare să fie sănătos, cu carnetul de sănătate vizat la zi, muncitorii fiind obligați să efectueze periodic următoarele examene medicale: examen clinic general, examen serologic, microradiografie şi examen copro-parazitologic.

În unitățile din industria alimentară precum şi în cele ale alimentației publice (restaurante, cantine, fast-food-uri etc.) este obligatorie utilizarea echipamentului de protecție corespunzător, curat şi complet. Acesta se schimbă zilnic sau ori de câte ori este nevoie. Igienizarea echipamentului se face în incinta unității respective, cu respectarea etapelor fluxului tehnologic şi evaluarea încărcăturii microbiene a acestuia. În plus toate spațiile trebuie să fie dotate cu un număr suficient de dispozitive de spălare a mâinilor, au atât sursă de apă rece cât şi de apă caldă, se acționează prin procedee care evită utilizarea mâinilor (celulă fotoelectrică) şi sunt prevăzute cu rezervoare de săpun lichid şi prosoape de hârtie.

Evitarea contaminării cu microorganisme din tractul gastrointestinal mai presupune pe lângă dispozitivele de spălare a mâinilor şi existența unor grupuri sanitare amplasate lângă vestiare şi lângă spațiile tehnologice, ce sunt păstrate în condiții de maximă igienă, bine ventilate şi întreținute pentru a nu emana mirosuri. Grupurile sanitare destinate muncitorilor din parcul de animale sau sectoarelor de produse necomestibile vor fi distincte de cele ale personalului din sectoarele de producere a produselor comestibile.

Operatorii cu activitate în domeniul alimentar trebuie să se asigure că persoanele care manipulează alimente sunt instruite în probleme de

igienă a alimentelor, proporţional cu activitatea desfăşurată, şi că cei responsabili pentru elaborarea şi menţinerea procedurii de lucru sau pentru punerea în aplicare a ghidurilor aferente au primit instruirea corespunzătoare în aplicarea principiilor HACCP.

12.5. Hrana animalelor

Menţinerea stării de sănătate a animalelor şi implicit asigurarea siguranţei consumatorilor produselor de origine animală este influenţată şi de calitatea furajelor. Atunci când acestea sunt alterate, mucegăite sau infestate cu alţi paraziţi acestea nu se admit în alimentaţia animalelor. Microorganismele din hrana uscată se răspândesc în mediul înconjurător şi este de aşteptat ca ele să apară în adăposturi şi pe pielea animalelor. Furajele pot fi o sursă de salmonele pentru păsări şi alte animale de fermă, iar nutreţurile însilozate sunt cunoscute ca posibile surse de *Listeria monocytogenes*. La vacile de lapte tipurile de microorganisme din laptele crud pot să reflecte microorganisme din apă atunci când nu sunt aplicate procedurile corecte de mulgere sau pot să reflecte mediului înconjurător.

Dintre măsurile preventive ce se pot aplica în igiena alimentaţiei sunt controlul frecvenţei şi modului de efectuare a decontaminării furajelor, utilajelor şi spaţiilor de prelucrare a acestora, verificarea modului de depozitare a furajelor şi respectarea măsurilor de profilaxie generală.

Calitatea materiei prime şi a produsului finit din unităţile de producere a nutreţurilor combinate se determină în laboratoarele uzinale sau alte laboratoare specializate.

12.6. Aerul şi praful

În general tipurile de microorganisme din aer şi praf sunt acelea care se redistribuie în mod constant în mediul înconjurator. Cu toate că atmosfera nu are propria ei microfloră, capabilă de creştere şi multiplicare în aer, microorganismele sunt constant prezente în aceasta. În aer microorganismele se găsesc fie înglobate în particule de apă fie pe suprafaţa particulelor de praf, formând picături de secreţie, nuclee de picături sau praf microbian.

Picăturile de secreţie îşi au originea în secreţiile respiratorii evacuate prin strănut, tuse sau în momentul comunicării (prin muget, nechezat, latrat etc.), au circa 100µ şi sedimentează relativ repede. Nucleele de picături sunt similare cu precedentele dar au dimensiuni mai mari şi persistă mai mult în aer. Praful microbian este format din particule de praf la care au aderat microorganisme şi sedimentează ceva mai greu.

Indiferent de forma în care microorgansimele se găsesc în aer acestea pot determina îmbolnăviri la animale şi om consecutiv inhalării sau ingerării dacă au sedimentat pe produsele alimentare.

Evaluarea presiunii infecțioase din atmosferă conferă un indiciu orientativ asupra riscului de transmitere a unor boli infecțioase prin contact sau prin inhalare. Cele mai frecvente metode utilizate pentru aceasta sunt determinarea numărului total de germeni la 37°C, streptococii hemolitici şi viridans, stafilococii şi colibacilii. Deşi majoritatea microorganismelor pot fi găsite la un moment dat în aer sau praf, în cursul unui proces de prelucrare a alimentelor cele care persistă sunt majoritar bacterii Gram pozitive. Dintre fungi este de aşteptat ca o serie de mucegaiuri să apară în aer şi praf împreună cu unele levuri. Dominanta microbiană variază funcție de sezon, constatându-se preponderența bacteriană în sezoanele de primăvară şi vară şi dominanța ciupercilor toamna şi iarna.

Cunoaşterea detaliilor de formare şi menținere în aer şi praf a microorganismelor permite elaborarea unor strategii de prevenire şi control eficiente. Astfel, ar fi de preferat ca unitățile alimentare să utilizeze sisteme de ventilație cu filtre care să reducă numărul de germeni prezenți în aerul din afara incintei de lucru la introducerea lui în halele de producție, iar ventilația naturală să fie utilizată doar în spațiile care nu sunt destinate preparării produselor alimentare.

Tabel 12.1.

Genuri microbiene ce pot fi întâlnite în alimente

Bacterii			
Acinetobacter	*Corynebacterium*	*Leuconostoc*	*Salmonella*
Aeromonas	*Enterobacter*	*Listeria*	*Serratia*
Alcaligenes	*Enterococcus*	*Micrococcus*	*Shewanella*
Arcobacter	*Erwinia*	*Moraxella*	*Shigella*
Bacillus	*Escherichia*	*Paenibacillus*	*Staphylococcus*
Brochothrix	*Flavobacterium*	*Pantoea*	*Vagococcus*
Campylobacter	*Hafnia*	*Pediococcus*	*Vibrio*
Carnobacterium	*Kocuria*	*Proteus*	*Weissella*
Citrobacter	*Lactobacillus*	*Pseudomonas*	*Yersinia*
Clostridium	*Lactococcus*	*Psychrobacter*	
Mucegaiuri			
Alternaria	*Byssochlamys*	*Geotrichum*	*Rhizopus*
Aspergillus	*Cladosporium*	*Monilia*	*Trichothecium*
Aureobasidium	*Colletotrichum*	*Mucor*	*Wallemia*
Botrytis	*Fusarium*	*Penicillium*	*Xeromyces*
Drojdii			
Brettanomyces	*Candida*	*Cryptococcus*	*Saccharomyces*
Issatchenkia	*Kluyveromyces*	*Pichia*	*Rhodotorula*
Schizosaccharomyces	*Torulaspora*	*Debaryomyces*	*Zygosaccharomyces*
			Hanseniaspora

Protozoare

Cryptosporidium parvum	*Cyclospora cayetanensis*	*Entamoeba histolytica*	*Toxoplasma gondii*
Giardia lamblia			

Capitolul 13
Tipuri de fermentaţii utilizate în industria alimentară

Considerate mai de grabă fenomene chimice sau biochimice decât interacțiunii ale microorganismelor cu diferite substraturi din mediu, fermentațiile cu aplicabilitate în industria alimentară constituie un domeniu de cercetare atât pentru microbiologi cât şi pentru biologi, biochimişti şi tehnologi din industria alimentară.

Fermentațiile sunt definite ca procese cu pierderi mici de energie în care molecule organice servesc deopotrivă ca donori şi acceptori de electroni şi în urma cărora din moleculele metabolizate nu a fost extras întregul potențial energetic (nu sunt complet oxidate). Majoritatea compuşilor naturali sunt degradați prin intermediul microbilor. În mediile lipside de oxigen (sau alt acceptor anorganic corespunzător de electroni). Fermentația poate implica orice moleculă care poate fi oxidată. Substraturile tipice includ zaharuri (ex.: glucoza) şi aminoacizi. În general, produsele tipice ale fermentațiilor sunt dependente de substratul de reacție, dar pot incude acizi organici (acid lactic, acid acetic), alcooli (alcool etilic, alcool metilic, alcool butiric), cetone (acetona) şi gaze (H_2 and CO_2).

Fermentațiile cel mai frecvent utilizate în industria alimentară sunt următoarele:

- Fermentația lactică
- Fermentația malo-lactică
- Fermentația alcoolică
- Fermentația propionică
- Fermentația butirică
- Fermentații oxidative (aerobice)
- Fermentația celulozică
- Fermentația anaerobă metanică

Pe lângă acestea în mediul înconjurător, microorganimele sunt implicate în multe alte tipuri de fermentații (hexonice, pentonice, aminoacidice, poliolice etc.) importante în biologia ecosistemelor. Cu toate că produsele finale sunt diferite, fermentațiile anaerobe şi aerobe au o legătură metabolică: din glucide se obține în faza inițială acidul piruvic, iar din acesta prin reacții redox, decarboxilare, carboxilare se formează sub acțiunea unui anumit sistem enzimatic o serie de produse finale.

Importanța acidului piruvic în procesele fermentative se datorează statutului său de produs intermediar în mai multe căi metabolice. Calea de metabolizare a acidului piruvic se află sub influența mediului şi a

variatelor microorganisme implicate în procesul fermentativ.

Cu toate că oamenii au utilizat mii de ani fermentațiile, biochimia ce guvernează aceste procese metabolice a fost în mare parte lămurită abia în ultima sută de ani. Bagajul informațional necesar controlării şi optimizării fermentațiilor a fost achiziționat prin cercetări experimentale ce au presupus numeroase încercări soldate destul de des cu eşecuri. Prin stăpânirea proceselor fermentative a fost posibilă obținerea unor sortimente variate de pâine, iaurt, brânzeturi, bere sau vin.

13.1. Fermentația lactică

Fermentația lactică se defineşte ca procesul biologic în urma căruia principalul produs rezultat îl constituie acidul lactic. Acest tip de fermentație este frecvent întâlnit în produsele agro-alimentare destinate consumului uman sau zootehnic şi poate fi produsă de bacterii, mucegaiuri şi drojdii.

Bacteriile producătoare de acid lactic pot fi mezofile (28-35^oC), psihrofile (10^oC) sau termofile (35-62^oC), homofermentative (produc numai acid lactic) sau heterofermentative (produc în principal acid lactic, dar şi CO_2, etanol sau acid propionic).

Bacterii lactice mezofile homofermentative se izolează frecvent din lapte (*Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum*), iar cele heterofermentative cu importanță alimentară din vin (*L. buchnerii*), bere (*L. pastorianus*), varză murată (*L. brevis)*, melasă (*L. buchnerii*) şi lapte (*L. brevis*). Termobacteriile lactice heterofermentative se izolează frecvent din lapte şi derivate din lapte: *Lactobacillus lactis din* lapte şi brânză, *Leuconostoc caucasicus* din brânză şi chefir şi *L. helveticus* din brânză. Termobacteriile lactice homofermentative se izolează frecvent din iaurt (*L. thermophilus* şi *L. bulgaricus*) şi din plămezi cereale (*L. delbruckii*).

Aceste bacterii produc acid lactic din variate surse de carbohidrați cum ar fi mălaiul, făina de cartofi, melasa şi zerul. Când pentru obținerea acidului lactic sunt utilizate produse ce conțin amidon, acestea sunt în primă fază hidrolizate în zaharuri simple (maltoză - dizaharid cu două molecule de glucoză sau lactoză - dizaharid compus din glucoză şi fructoză). Mediul este apoi suplimentat cu o sursă de azot şi carbonat de calciu fermentația uscată este urmată de inocularea lactobacililor homofermentativi cum ar fi *Lactobacillus bulgaricus* sau *Lactobacillus delbruckli*. În timpul fermentației temperatura este menținută la 43-50^oC, în funcție de microorganism şi de mediu, este menținut sub omogenizare costantă pentru a rămâne carbonatul de calciu în suspensie. După finalizarea fermentației (4-6 zile), produsul rezultat este încălzit la 82^oC şi filtrat. Filtratul care conține şi lactat de calciu este uscat prin pulverizare

după tratarea cu sulfit de sodiu. Pentru a se obține acidul lactic, lactatul de calciu este tratat cu acid sulfuric şi purificat. În urma fermentației lactice se obține, teoretic, un gram de acid lactic dintr-un gram de zahar fermentescibil.

În funcție de agentul de fermentație, temperatură sau compoziția mediului acidul lactic obținut poate fi dextrogir, levogir sau racemic.

Glicoliza prin calea Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) este cea mai uzuală suită de reacții de oxidare a glucozei în piruvat şi multe bacterii, animale şi plante utilizează această cale glicolitică în metabolismul lor. EMP este o parte esențială a catabolismului multor organisme. Cu toate acestea, nu este singura metodă de fermentare a glucozei. Trebuie reținut că bacteriile sunt deosebit de „creative" şi este posibilă existența unor căi metabolice diferite la specii diferite. EMP poate fi împărțit în trei etape mari: activarea glucozei, clivarea hexozei şi extragerea energiei.

Glucoza este o moleculă relativ stabilă şi pentru degradare aceasta trebuie mai întâi destabilizată prin adăugarea de compuşi fosfați cu potențial energetic înalt. În primă fază o grupare fosfat este donată de către ATP (sau de către fosfoenolpiruvat – sursa de fosfat este dependentă de specia de microb) moleculei de glucoză pentru a forma glucozo-6-fosfatul. Molecula este izomerizată la fructozo-6-fosfat (un alt zahar) şi se adaugă o a doua grupare fosfat. Fructozo-1,6-bifosfatul este mai uşor de „atacat" decât glucoza şi este pregătit pentru a fi clivat.

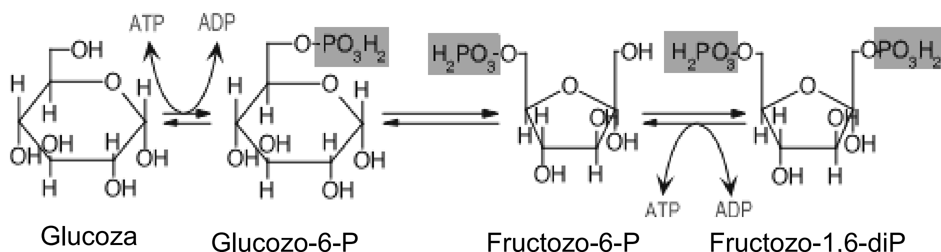


Fig.13.1. Activarea glucozei prin fosforilare cu ATP

Fructozobifosfat-aldolaza va cliva molecula de fructoză fosforilată în compuşi cu 3 atomi de carbon: gliceraldehid-3-fosfat (GAP) şi dihidroxiacetonfosfat (DAP) creându-se compuşii necesari celei de a doua faze a glicolizei EMP destinate producerii piruvatului.

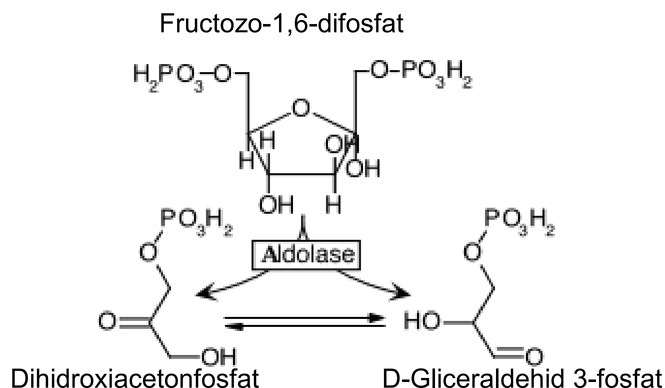


Fig.13.2. Clivarea fructozei de către aldolază.

În următoarea reacție DAP este transformat în GAP, ce poate fi întrodus în restul glicolizei EMP. Următorul pas are o importanță deosebit de mare. Fosfatul anorganic este adăugat la GAP pentru a produce 1,3-bifosfogliceratul (BPG). Nu este nevoie de energie şi în fapt electronii sunt transferați de la GAP la NAD^+. Această reacție este beneficiul declanşării acestei căi EMP şi fosfații adăugați aici sunt mai târziu transferați la ADP pentru a forma ATP. După numeroase reacții enzimatice, produsul final al căii EMP este piruvatul.

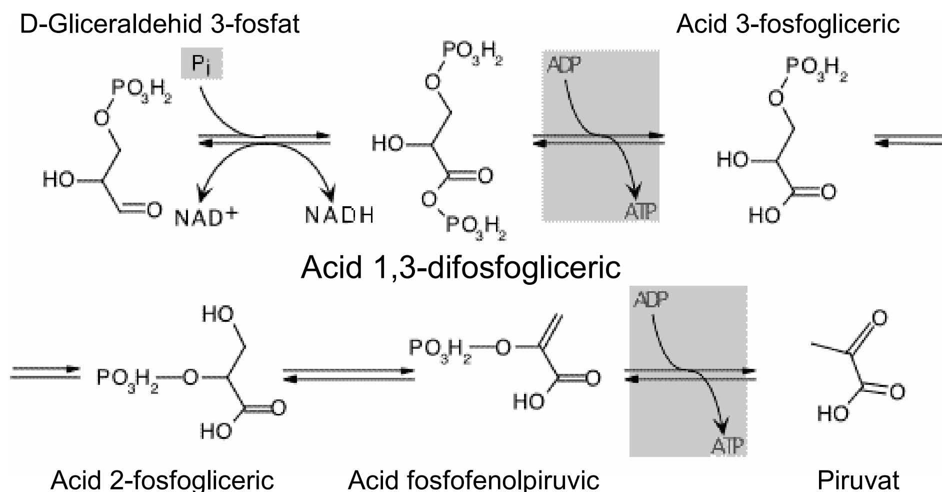
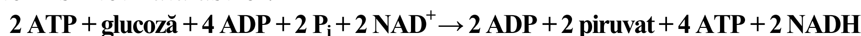


Fig.13.3. Extragerea energiei

Din punct de vedere energetic întreaga reacție a glicolizei EMP poate fi sintetizată astfel:



2 ATP + glucoză + 4 ADP + 2 P_i + 2 $NAD^+ \rightarrow$ 2 ADP + 2 piruvat + 4 ATP + 2 NADH

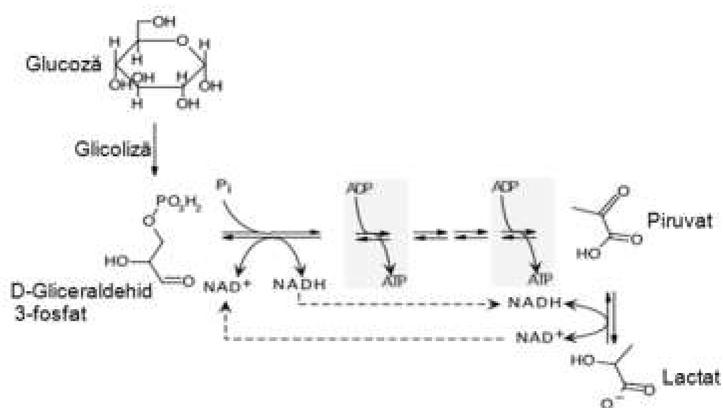


Fig. 13.4. Obținerea lactatului de către bacterile homofermentative. Calea de producere utilizată este identică cu a glicolizei, iar produsul final este lactatul.

Se observă că în reacție energia consumată este de 2ATP şi sunt obținute 4 ATP, cu un beneficiu de 2 ATP la o moleculă de glucoză. Concluzia este că se depune un efort substanțial pentru doar 2 ATP. Fermentațiile nu oferă cantități mari de energie şi aceasta explică de ce se fermentează atât de mult substrat fără a se dezvolta prea mulți microbi.

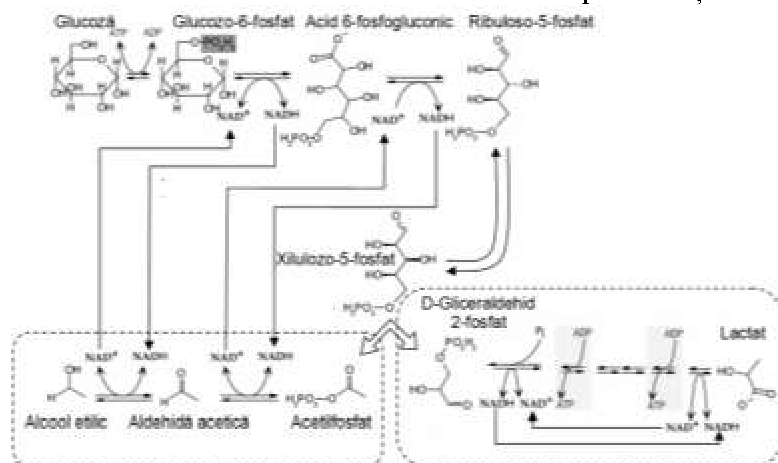


Fig. 13.5. Fermentația glucozei de către bacteriile heterofermentative. Se observă că partea superioară a ciclului glicolitic nu este utilizată. NADH este reciclat şi eliberat în cantități mici. Este generată o singură moleculă de ATP dintr-o moleculă de glucoză germentată.

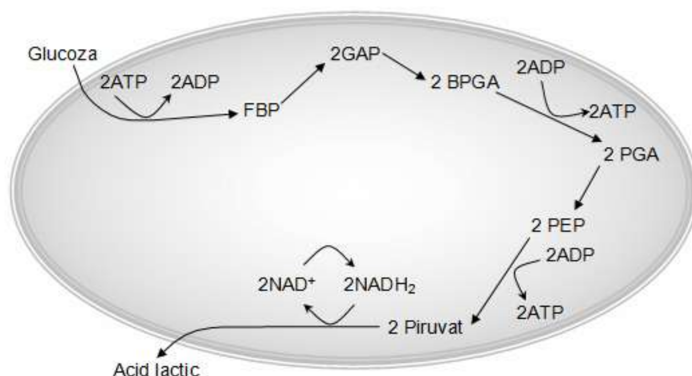


Fig. 13.6. Ciclul EMP modificat de transformare a glucozei în alcid lactic cu ajutorul lui *Lactobacillus* şi *Streptococcus* în condiţii de aerobioză sau anaerobioză

Bacteriile homofermentative lactice utilizează calea EMP descrisă mai sus pentru a produce piruvat care este redus ulterior în lactat, utilizând în acest scop excesul de NADH. Alte bacterii utilizează căi alternative pentru a genera acid lactic din glucoză.

În mecanismul fermentaţiei lactice produs de bacteriile heterofermentative produşii intermediari prezintă uneori o importanţă deosebită la obţinerea unor alimente cu caracteristici fizico-chimice (cantitatea de aminoacizi sau polipeptide) sau organoleptice (culoare, miros, consistenţă, gust, aromă) specifice.

13.2. Fermentaţia malo-lactică

Fermentaţia malo-lactică se defineşte ca procesul biochimic prin care acidul malic din fructele necoapte este transformat în acid lactic şi dioxid de carbon de către microorganisme (*Streptococcus mucilaginosus vini, Streptococcus malolacticus, Micrococcus multivorax, Micrococcus malolacticus, Micrococcus variococcus, Bacterium gracile, Pedicoccus vini*). În urma acestui proces are loc reducerea acidităţii fructelor cu peste 30% (0,33g CO_2/g acid malic).

Această fermentaţie are importanţă însemnată în vinificarea strugurilor necopţi sau cu aciditate ridicată deoarece prin reducerea acidităţii vinurile devenind mai agreabile la gust. În urma selecţionării naturale a unor bacterii lactice heterofermentative este favorizată reducerea conţinutului de acid malic. Această selecţie se realizează prin menţinerea temperaturii la valori agreate de bacteriile heterofermentative, adaos de vin cu pH mai mic de 3,6 peste mustul ce fermentează, tragerea

mai rapidă a vinului de pe drojdie, sulfitarea mustului, diluarea mustului, suplimentarea concentrației de zaharuri etc.

Transformarea acidului malic în acid lactic şi dioxid de carbon se realizează printr-o succesiune de reacții prin care, sub acțiunea enzimei malat-dehidrogeneza, în prezența difosfopiridinnucleotidei (DPN) şi a ionilor de Mg^{2+}, din acid maleic se obține acid oxal-acetic. Din acidul oxal-acetic sub acțiunea enzimei oxal-acetat decarboxilaza se obține acid piruvic, iar acesta este redus de lactatdehidrogenază în acid lactic şi dioxid de carbon.

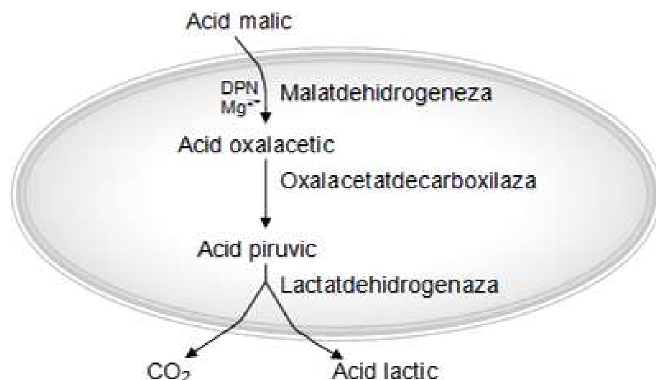


Fig. 13.7. Fermentația malo-lactică produsă de bacterii malolactice

13.3. Fermentația alcoolică

Fermentația alcoolică presupune transformarea în alcool etilic şi acid carbonic a zaharurilor sub influența anumitor microorganisme.

Se consideră că adevărații agenți ai fermentației alcoolice sunt drojdiile, însă există un număr însemnat de ciuperci care descompun zahărului cu formare de alcool etilic în condiții de anaerobioză dar şi drojdii (*Pichia hialospora*) care nu fermentează alcoolic zaharurile. Deşi fermentația alcoolică se declanşează spontan s-a observat că aceste microorganisme din natură, neselectionate, au o activitate inegală şi slabă ceea ce a determinat ca în sistemul industrial de producere a alcoolului să se apeleze la drojdii cultivate, selecționate în laborator după capacitatea lor mărită de a fermenta alcoolic şi adaptabilitatea la viața anaerobă.

Drojdiile utilizate în fabricarea alcoolului etilic fac parte din genul *Saccharomyces Rees (Endomytacceae)*, cu reprezentanții: *Saccharomyces acidifaciens, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces chevalieri, Saccharomyces elegans, Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomyces fructuus,* şi *Saccharomyces ludwigii.*

Unele drojdii din genul *Zygosaccharomyces* sunt capabile să

suporte concentrațiile mari de zahăr şi astfel să determine fermentarea alcoolică a acestora, situație întâlnită la fermentarea mierii sau a siropurilor cu concentrații ridicate de zahăr. De asemenea şi alte microorganisme cum sunt unele bacterii (*Bacillus macerans, B. gracile, B. etilicus*) sau mucegaiuri *(Amylomyces rouxii, Mucor eumycetes, Mucor racemosus, Rhizopus orizae*, *Dematium pullulans, Aspergillus orizae, Penicillium glaucum*) sunt capabile să producă prin fermentație alcool etilic.

Mecanismul degradării hidraților de carbon cu transformarea lor în alcool etilic reuneşte mai multe reacții enzimative derulate în prezența şi cu ajutorul adenozin şi tiamin fosfaților, coenzimei A, vitaminelor B1, B2, B5, B6, PP precum şi a altor componente esențiale, la care se adaugă factorii implicați în metabolism, dintre care mai importanți sunt: temperatura (se impune cunoaşterea valorii optime de creştere a fiecărei drojdii în parte), pH-ul (3,5-4,7), presiunea osmotică (<60 kgf/cm^2), potențialul redox, concentrația de alcool rezultată (la 18% se inhibă dezvoltarea drojdiilor superioare, iar la 4-5% cea a drojdiilor inferioare), inhibitorii şi activatorii micoorganismelor care efectuează fermentația alcoolică (oxigenul, dioxidul de carbon, antisepticele, microelementele minerale).

Enzime de bază implicate în principalele reacții ale acestei fermentații sunt:

- în reacțiile de fosforilare si formare a trizofosfatilor: hexokinaza, fosfoglucoizomeraza, fosfofructokinaza, aldolaza;
- în reacțiile de dehidrogenare a aldehidei fosfoglicerice: glicerofosfatdehidrogenaza şi fosfogliceratkinaza;
- în reacțiile de formare a acidului piruvic: glicerofosfatmutaza, enolaza;
- în reacțiile de formare a alcoolului etilic: alcooldehidrogenaza.

Una din cele mai familiare fermentații este conversia glucozei în alcool etilic pentru obținerea băuturilor alcoolice. După formarea piruvatului, alcoolul etilic este obținut prin două reacții simple. În prima fază CO_2 este extras din piruvat pentru a forma aldehida acetică, apoi aldehida acetică este redusă cu NADH pentru a forma alcoolul etilic.

Căile fermentative ale glicolizei EMP la piruvat sunt identice atât la bacteriile lactice (*Lactobacillus*) cât şi la drojdii (*Saccharomyces*), diferența între aceste două căi fiind maniera în care are loc reducerea acidului piruvic cu obținerea de produşi diferiți.

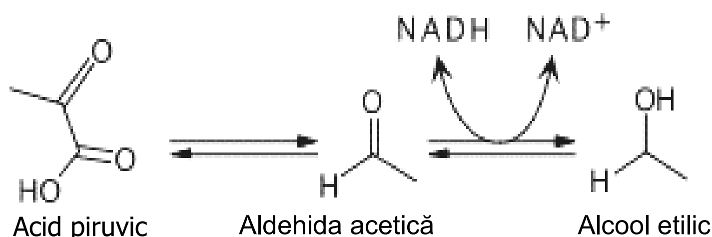


Fig. 13.8. Oxidarea lui NADH. Aldehida acetică este redusă la alcool etilic (substanța activă în fabricile de alcool). Aceasta este ultima etapă a fermentația cu drojdii a glucozei în etanol.

13.4. Fermentația propionică

Fermentația propionică este definită ca procesul biochimic anaerob în urma căruia prin reacții enzimatice specifice bacteriilor propionice substratul glucidic este transformat în acid propionic.

Aceasta este o fermentație neuzuală efectuată de bacterii incluse în genurile *Corynebacterium, Propionibacterium* şi *Bifidobacterium.*

Principala utilitate a fermentației propionice se regăseşte în producerea brânzeturilor maturate tip Schweitzer, cu pasta tare şi goluri interioare, la care pe lângă incluziile alveolare şi creşterea valorii nutritive, determină şi particularitățile organoleptice ale produsului. Prezența acestor bacterii la maturarea pâinii determină o fermentație suplimentară, cu transformarea acidului lactic în acid propionic şi bioxid de carbon ceea ce duce la creşterea pâinii şi obținerea unui gust mai bun.

Specii cu o mare importanță alimentară sunt *Propionbacterium shermanii, Propionibacterium freudenreichii van Niels* (utilizate la preparatele din lapte şi în panificație) şi *Propionibacterium rubrum van Niels* (produce petele roşii pe brânzeturi). Taxonomic bacteriile propionice fac parte din familia *Lactobacteriaceae*, genul *Propionibacterium*,

Bacterile propionice sunt mezofile (cresc la 35-37^{o}C) se dezvoltă pe medii neutre, slab acide (pH=6,9) şi pot folosi ca substrat în fermentație hexoze (glucoză, lactoză, maltoză), glicerină sau acizi organici (acid lactic, acid malic). Ele sunt inactivate la 60 ^{o}C şi de soluția NaCl 4%.

Deşi bacteriile sunt utilizate în principal pentru fermentarea acidului lactic în acid propionic, acestea pot fermenta direct zaharurile în acid propionic. Formarea acidului propionic este complexă şi procesul indirect implică 5 sau 6 reacții. Per total, 3 moli de acid lactic sunt convertiți în 2 moli de acid propionic + 1 mol de acid acetic + 1 mol de CO_2, şi 1 mol de ATP este eliberat din proces.

13.5. Fermentația butirică

Fermentația butirică se defineşte ca procesul biologic anaerob de metabolizare a diverselor surse (ex: hidrocarbonați) în vederea asigurării energiei necesare desfăsurării funcțiilor vitale şi multiplicării bacteriilor, ce are ca produs final acidul butiric.

Majoritatea bacteriilor butirice aparțin genului *Clostridium*. Echipamentul enzimatic deținut de bacteriile butirice permite utilizarea unei largi varietăți de medii de creştere, de la substraturi complexe proteice, pectinice sau poliglutidice până la compuşi simplii ca acizii organici, alcoolii, monoglucidele sau compuşii cu azot.

Această caracteristică face posibilă identificarea bacteriilor butirice atât în sol, dejecții şi produse agroalimentare neprelucrate cât şi în produse lactate sau conserve. Pe lângă acid butiric clostridiile formează, în urma fermentării zaharurilor, acid acetic, CO_2 şi H_2. De asemenea mai pot fi observate cantități mici de alcool etilic şi alcool izopropilic. Importanța cunoaşterii acestor bacterii se datorează efectului negativ avut asupra produselor agricole şi alimentare, degradând organoleptic băuturile alcoolice şi brânzeturile sau chiar mai grav putând duce la toxiinfecții alimentare fatale.

13.6. Fermentații oxidative (aerobe)

Fermentațiile oxidative reunesc reacțiile biochimice enzimatice realizate în prezența oxigenului atmosferic în urma cărora se obțin acizi organici (acid acetic, acid citric, acid succinic, acid fumaric etc). Cele mai frecvente fermentații aerobe sunt: fermentația acetică (fabricarea oțetului), fermentația proteică şi fermentația pectolitică.

Aceste fermentații nu trebuie confundate cu respirația aerobă, în care substanțele sunt oxidate complet: energie + CO_2 + H_2O.

13.6.1. Fermentația acetică

Fermentația acetică se defineşte ca procesul biologic aerob enzimatic prin care din alcoolul etilic microorganismele (bacteriile acetice) produc acid acetic.

Bacteriile acetice, principalii agenți ai fermentației acetice, sunt încadrate taxonomic în familia *Pseudumonodaceae* genurile *Acetobacter* şi *Acetomonas (Gluconobacter)*. Au formă bacilară, cu marginile rotunjite, umflate sau uşor curbate, sunt nesporulate şi Gram negative. Unele dintre acestea au fost izolate din plămezi amidonoase (*Gluconobacter suboxidans, Acetobacter industrium*), bere (*Acetobacter kutzingianum, A.*

pasteurianum) şi vin (*A. ascendens, A. teurianum*), iar altele sunt folosite ca bacterii acetice industriale (*Bacterium acetigenum*). Majoritatea bacteriilor acetice sunt mezofile (19 – 36^{o}C), iar producţia de acid acetic poate atinge şi concentraţia de 11% (*Bacterium schutzenbachii*).

Identificarea caracteristicilor bacteriilor acetice şi a condiţiilor necesare derulării fermentatiei acetice a determinat controlul acesteia şi în mod firesc stabilirea strategiilor de prevenire şi combatere a oţetirii vinului. Totuşi, utilitatea fermentaţiei acetice este dominată de obţinerea oţetului, un produs alimentar destinat marinării unor produse culinare sau conservării fructelor şi legumelor. Tot unei fermentaţii acetice sunt supuse şi boabele de cacao pentru a se obţine aroma şi alte caracteristici specifice.

Condiţiile necesare derulării fermentaţiei acetice a vinului (oţetirea vinului) sunt: volum alcool <12%, aciditate volatilă la vinurile albe >1,4 g/l şi la vinurile roşii >1,7 g/l, oxigenare, temperatura în limitele 19 – 38^{o}C. Oţetirea vinului trebuie prevenită prin tratamente antiseptice (acid sulfuros liber) întrucât odată contaminat vinul, nu mai exista remediu curativ. O altă măsură profilactică este prevenirea dezvoltării coloniilor de *Drosophyla melanogaster* (musculiţa oţetului), care este considerată vector al bacteriilor acetice.

Producerea acidului lactic de către bacteriile lactice este o consecinţă a creşterii lor anaerobe. Electronii, absorbiţi de către NAD+ în timpul glicolizei sunt puşi la dispoziţie prin reducerea piruvatului care consecutiv este convertit în acid lactic. Dacă în loc de piruvat este furnizat un alt donator de electroni, piruvatul este liber să fie utilizat în alte scopuri metabolice. O cale posibilă este decarboxilarea, printr-una din cele câteva căi posibile, pentru a forma acidul acetic cu producerea concomitentă de ATP. Acidul acetic poate fi de asemenea obţinut prin oxidarea directă a acidului lactic.

Una din căile posibile de producere ale acidului acetic este cu ajutorul lui *Lactobacillus plantarum*. În condiţii de limitare a glucozei producţia de celule bacteriene de *L. plantarum* este crescută prin condiţii aerobe, dar rata de creştere nu este modificată. La niveluri mari de glucoză, imaginea este puţin mai complicată, şi numeroase studii au arătat că rata creşterii este întârziată de oxigen (Archibald & Fridovich, 1981, Murphy & Condon, 1984b, Tseng & Montville, 1992). Această inhibare a creşterii se întâlneşte înaintea creşterii producţiei de H_2O_2, iar aceasta reprezintă probabil efectul direct al toxităţii oxigenului. Totuşi, chiar la concentraţii mari de glucoză, creşterea celulelor bacteriene este încă mare în condiţii aerobe, şi o creştere mare a celulelor bacteriene în condiţii aerobe s-a observat că este asociată cu o creştere în producţia de acetat (Sedewitz *et al.*, 1984b). Aceste observaţii sunt în concordanţă cu ipoteza că acetatul şi ATP-ul sunt generate din piruvat. Acidul lactic poate servi

de asemenea ca o sursă de energie în condiții de anaerobioză. Murphy *et al.* (1985) au observat că la adăugarea de acid lactic în culturile de *L. plantarum* în absența altor surse de energie este posibilă dezvoltarea modestă în condiții de aerobioză, dar nu şi în condiții anaerobe. Această imagine este întrucâtva confuză deoarece în cercetările acestora se obțin 4 moli de acetat din fiecare mol de lactat furnizat – o discrepanță ciudată ce nu a mai fost comunicată (într-un alt experiment (Murphy & Condon, 1984b) utilizându-se glucoză, s-au obținut 1,3 moli acetat din 1 mol glucoză – un rezultat mult mai apropiat de aşteptări).

Producerea aerobă a acetatului de *Lactobacillus plantarum*

Sunt posibile trei mecanisme de producere a acetatului din glucoză de către bacteriile homofermentative acetice: prin oxidarea directă a acidului lactic, prin oxidarea via acetil CoA a acidului piruvic, şi prin oxidarea directă a acidului piruvic. Aceste căi sunt prezentate schematic mai jos:

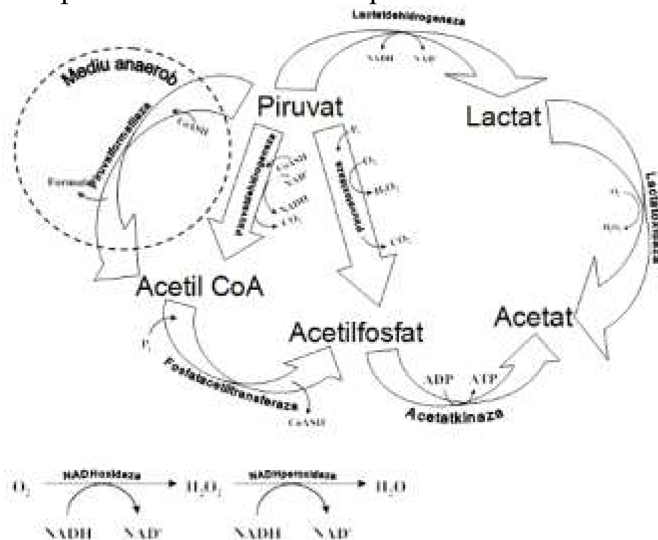


Fig. 13.9. Producerea acidului acetic de către bacterii lactice homofermentative. În condiții de aerobioză acest mecanism central (via piruvatoxidază şi acetatkinază) este utilizat şi de *Lactobacillus plantarum*.

Producerea acidului acetic prin oxidarea lactatului

Oxidarea directă a lactatului este realizată de o lactatoxidază funcțională. Kandler (1983) a raportat această enzimă la *L. plantarum*. Extractul acelular poate oxida lactatul, dar în concordanță cu Murphy şi col. (1985) aceasta se realizează indirect ca un rezultat al reducerii în piruvat de către LDH, care este ulterior oxidat de către piruvatoxidază. Ca

o dovadă a acestora, ei au găsit că această oxidare a lactatului poate fi prevenită prin dializă, dar aceasta ar putea fi restabilită prin adăugarea de DCPIP (ce poate fi utilizat de LDH ca un substitut pentru NAD^+). Dar ipoteza lui Murphy şi col. nu poate explica observațiile lui Götz şi col. (1980), în care oxidarea lactatului a fost observată în absența formării peroxidului – atât piruvatoxidaza cât şi lactatoxidaza produc H_2O_2. Mecanismul bazat pe observațiile lui Götz şi col. rămâne neexplicat.

Oxidarea piruvatului *via* acetil CoA la acid acetic

Acetil-CoA poate fi fosforilat, prin intermediul fosfatacetiltransferazei, în acetilfosfat. Acesta este apoi defosforilat de acetatkinază, cu sinteza concomitentă de ATP. Acesta este un mecanism uzual pentru formarea ATP-ului de o gamă largă de bacterii lactice, dar este puțin probabil ca această cale să fie responsabilă de producerea pe cale aerobă a acetatului de către *L. plantarum*. Acesta are două mecanisme de sinteză a acetil CoA din piruvat. Primul mecanism, catalizat de piruvatformatligază a fost observat în unele tulpini de *L. plantarum* (Lindgren şi col, 1990). Enzima este inhibată de oxigen, nemaiputând fi responsabilă de formare acetatului în condiții aerobe. Al doilea mecanism, catalizat de piruvatdehidrogenază, este activat în condiții aerobe (Condon, 1987). Piruvatdehidrogenaza nu a fost niciodată demonstrată în mod direct la *L. plantarum* (Dirar şi Collins, 1973, Tseng şi Montville, 1990), dar Kennes *et al.* (1991) furnizează dovezi circumstanțiale pentru existența acesteia. Ei au găsit că acest acetat şi CO_2. ca metaboliți de bază sunt caracteristici pentru piruvatdehidrogenază, iar acest lucru sugerează că cel puțin unele tulpini pot deține această enzimă. Totuşi, piruvatdehidrogenaza este activă numai în condiții aerobe şi de asemenea are nevoie de un acceptor extern de electroni pentru a regenera NAD^+ . În mod normal, pentru a forma lactatul, etanolul sau peroxidul de hidrogen aceasta are loc prin reducerea piruvatului, acetil CoA sau a oxigenului molecular.

Producerea acidului acetic prin oxidarea directă a piruvatului.

În prezența oxigenului, oxidarea piruvatului la acetil fosfat poate avea loc în mod direct. Ca şi la oxidarea indirectă, acetilfosfatul ce s-a format poate fi defosforilat de acetilkinază. Această oxidare directă a fost demonstrată la *L. plantarum* în numeroase ocazii (Dirar & Collins, 1973, Götz *et al.*, 1980, Murphy & Condon, 1984a, 1984b, Tseng & Montville, 1992, Frey & Hubert, 1993).

Reacțiile chimice derulate în cadrul acestei fermentații urmăresc oxidarea alcoolului etilic, cu formarea unor produşi intermediari (aldehida acetică activată şi aldehida acetică hidratată) din care va rezulta în final acidul acetic.

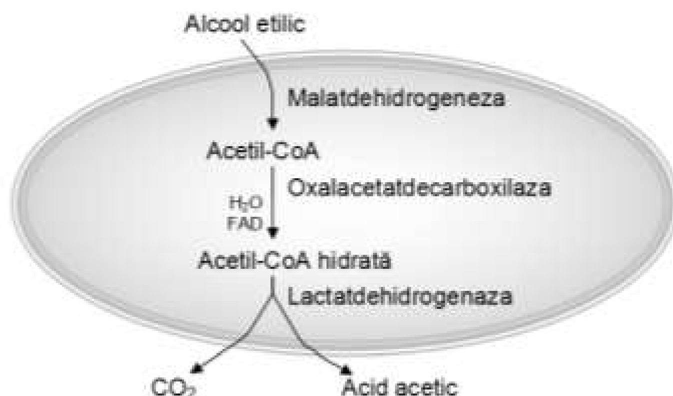


Fig. 13.10. Fermentația acetică

13.6.2. Fermentația citrică

Fermentația citrică reprezintă procesul de realizare al celui mai folosit acid organic alimentar: acidul citric (sarea de lămâie) şi este produs de fungi, drojdii şi bacterii. Totuşi, interes economic prezintă numai fermentația citrică produsă de unele ciuperci ale genurilor *Citromyces* şi *Aspergillus* ce dețin bagajul enzimatic necesar transformării glucozei în acid citric şi apă. Abilitatea fungilor de a produce acid citric a fost pentru prima dată descoperită de Wehmer în 1893 şi astăzi tot acidul citric produs în scop comercial este obținut prin fermentație de către aceste microorganisme. De atunci organismul cel mai frecvent utilizat în acest scop a fost *Aspergillus niger*. Ciclul de reacții biochimice enzimatice este similar cu cel al fermentației alcoolice, dar cu formarea de acid glicolic prin oxidarea aldehidei acetice în loc de alcool etilic. Prin combinarea a trei molecule de acid glicolic rezultă o moleculă de acid citric şi două de apă.

Randamentul obținerii acidului citric prin fermentație citrică este influențat de speciile microbiene, substratul utilizat şi gradul de aerare a culturii. Studiile au demonstrat că randamentul cel mai ridicat (90-100%) este obținut prin utilizarea ca substrat a zaharozei pe care se cultivă anumite specii de *Aspergillus, Penicillium şi Rhisopus* în condiții specifice bine determinate. Randamentul la utilizarea glucozei ca substrat poate

atinge 50% la utilizarea culturilor de *Citromyces pfefferianicus*.

În producerea acidului citric pot fi utilizate ca sursă de carbohidrați melasa de sfeclă sau de trestie de zahăr, sucroza, glucoza comercială, hidrolizate de amidon etc. Dintre acestea sucroza şi melasa pare a fi cele mai bune surse. Pentru producerea acidului citric materia primă este diluată până se atinge o concentrație de 25% zahăr şi se amestecă cu o sursă de azot şi alte săruri. Dacă se utilizează melasă, pH-ul mediului trebuie menținut în jurul valorii de 5, iar dacă se utilizează sucroză nivelul pH-ului trebuie să fie ceva mai mic, în jurul valorii de 3. Producerea acidului citric cu *A. niger* este puternic influențată de concentrația reziduurilor de metale cum ar fi fierul, magneziul, cuprul şi zincul din mediu. O concentrație corespunzătoare a acestor elemente este esențială pentru obținerea unei bune producții de acid citric, atât absența cât şi excesul nefiind benefice. Pentru optimizarea nivelului acestor microelemente materia primă este supusă unor tratamente cu ferocianuri, cărbune, agenți de chelatare sau rezine. S-a observat că prin adăugarea de metanol la o concentrație de 3-4% se schimbă randamentul producției de acid citric. Această fermentație este o fermentație aerobă şi, în consecință, aerarea corespunzătoare a mediului este esențială pentru succesul producției de acid citric.

În ultimii ani, producția de acid citric cu ajutorul drojdiilor a crescut în importanță prin descoperirea faptului că o varietate de drojdii cum ar fi *Candida* şi *Hansenula* produc acid citric din carbohidrați şi hidrocarbonați. Au fost semnalate tulpini de *Candida lipolytica* care par a fi bune producătoare de acid citric utilizând materii prime din cele mai variate. Mecanismul prin care fiecare din aceste drojdii produc acid citric pare să fie uşor diferit de mecanismul prin care acesta este produs de către fungi. După ce este finalizată fermentația se precipită citratul de calciu existent în bulionul de fermentație prin adăugarea de hidroxid de calciu. Este filtrat, spălat şi tratat cu acid sulfuric pentru a precipita sulfatul de calciu. Soluția conținând acid citric este apoi purificată prin tratarea cu rezine sau cărbune şi în final cristalizată.

Acidul citric este utilizat în industria alimentară, textilă şi farmaceutică. Este folosit de asemenea din ce în ce mai mult pentru extragerea gazelor toxice şi corozive din aer. Creşterea posibilităților de utilizare ale acestui acid organic a dus implicit la creşterea cererii lui.

Pe lângă fungi şi drojdii, posibilitățile utilizării bacteriilor în producerea acidului citric sunt de asemenea exploatate.

13.6.3. Fermentația oxalică

Fermentația oxalică este fenomenul biochimic enzimatic, realizat

sub acțiunea diverselor ciuperci şi bacterii, prin care este degradat substratul (glucidele, glicerina, peptonele, acidul citric, acidul succinic, acidul malic, acidul tartric, acidul acetic, alcooli etc.) până la acid oxalic. Totuşi, substratul preferat pentru obținerea acidului oxalic prin fermentație este zahărul, compus care sub acțiunea mucegaiului *Sterigmatocytis nigra* furnizează acid oxalic în cantitate mare, dacă fermentația are loc în prezența sărurilor de fier. Aceste săruri sunt indispensabile întrucât absența fierului face ca fermentația oxalică să devină citrică. De asemenea, cantitatea mare de acid oxalic poate fi produsă numai dacă aceasta este neutralizată cu substanțe alcaline introduse în mediul de cultură al microorganismelor utilizate.

13.6.4. Fermentația succinică, fumarică şi malică

Această fermentație se defineşte ca procesul de transformare a glucidelor sub acțiunea unor ciuperci din genurile *Mucor, Aspergillus* şi *Rhisopus* în acid succinic, acid fumaric şi acid malic. Se obține un randament de 70% la producerea acidului succinic şi fumaric din glucide sau acid acetic utilizând ciuperca *Mucor solonifer* în prezență de carbonat de calciu. Ulterior, sub acțiunea enzimei fumaraza are loc transformarea acidului fumaric în acid malic.

13.7. Fermentația celulozei

Celuloza este substratul asupra căruia acționează mai multe tipuri de microorganisme fermentative. În natură degradarea fermentativă a celulozei de către microorganisme are loc pe scară foarte largă, indiferent dacă oxigenul este sau nu prezent. Semnificația acestei fermentații, respectiv valoarea metaboliților rezultați, este deosebită în asigurarea fertilizării solului. Acest tip de fermentație este realizat de numeroase bacterii (aerobe şi anaerobe) şi de ciuperci.

Bacillus fossicularicum în urma fermentației hidrogenate a celulozei produce cantități semnificative de hidrogen, acid propionic, acid lactic, acid butiric, alcool etilic etc. *Bacillus metanicus* în urma fermentației celulozei produce metanul, întâlnit în cantități ridicate la fermentația bălegarului.

13.8. Fermentația anaerobă metanică

Fermentația anaerobă metanică se defineşte ca procesul de degradare anaerobă de către microorganisme a unor reziduuri (deşeuri animaliere, menajere, biomasă vegetală autumnală etc.) cu tranformarea

lor în metan, hidorgen şi alte hidrocarburi. Deoarece din acest proces se obține o mare producție de energie, fermentația anaerobă metanică poate fi folosită la nivelul fermelor şi gospodăriilor rurale prin realizarea unor instalații simple de fermentare şi captare a biogazului rezultat. Biomasa obținută în urma acestei fermentații constituie un îngrăşământ natural, ecologic, cu conținut foarte ridicat de humus, compuşi azotați şi carbon.

Principalele grupe de microorganisme capabile de fermentație anaerobă metanică sunt:

- grupa bacterilor anaerobe din genurile *Bacteroides, Clostridium, Ruminococcus şi Butyrivibrio* şi a bacterilor facultativ anaerobe (*Escherichia coli, Bacillus*) ce degradează celuloza, proteinele sau alți biopolimeri cu formare de H_2, CO_2, acid formic, acid butiric, acid propionic, alcool etilic şi alcool metilic;
- grupa microorganismelor care biodegradează produşii în aldehidă acetică activată: *Syntrophobacter*, *Syntrophomonas, Desulfovibrio;*
- grupa bacterilor metanogene care biodegradează substratul reprezentat de metaboliții din primele două etape (H_2, CO_2, acizii, alcoolii etc) în metan.

În continuare sunt prezentate câteva procese utilizate la fabricarea produselor alimentare fermentate.

Tabelul 13.1

Alimente şi produse	**Materia primă**	**Organismele de fermentare**	**Țara care îl produce uzual**
Produse lactate			
Kefir	Lapte	*Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Torula* sp.	Asia de Sud.Vest
Taette	Lapte	*S. lactis* var. *taette*	Peninsula Scandinavă
Tarhana	Făină de grâu şi iaurt	Lactici	Tucia
Produse din carne şi peşte			
Şunca afumată	Şuncă de porc	*Aspergillus, Penicillium* spp./	Sudul S.U.A.
Lebanon bologna	Vită	*Pediococcus cerevisiae*	Europa, S.U.A.
Sos de peşte	Peşte mic	*Bacillus* spp. halofilic	Sudul S.U.A.
Katsuobushi	Ton Skipjack	*Aspergillus glaucus*	Japonia
Produse din plante altele decât cele alcolice			

Alimente şi produse	Materia primă	Organismele de fermentare	Țara care îl produce uzual
Boabe de cacao	Fructe de cacao	*Candida krusei, Geotrichum* spp.	Africa, America de Sud
Boabe de cafea	Fructe de cafea	*Erwinia dissolvens, Saccharomyces* spp.	Brazilia, Congo, Hawaii, India
Kimchi	Varză şi alte legume	Bacterii acidolactice	Koreea
Măzline	Măzline verzi	*Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum*	Pretutindeni
Murături	Castraveți	*Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus plantarum*	Pretutindeni
Băuturi alcoolice			
Whisky Bourbon	Porumb, secară	*Saccharomyces cerevisiae*	S.U.A.
Cidru	Mere, altele	*Saccharomyces* spp.	Pretutindeni
Mezcal	Planta Century	Drojdii	Mexic
Sake	Orez	*Saccharomyces saki*	Japonia
Oțet	Cidru, vin	*Acetobacter* spp.	Pretutindeni
Vin	Struguri, alte fructe	Tulpini de *Saccharomyces ellipsoideus*	Pretutindeni

***

Energia furnizată este redusă şi microbii trebuie să fermenteze cantități mari de substrat pentru a produce suficientă energie necesară proceselor celulare.

Capitolul 14
Recoltarea probelor alimentare

14.1. Noțiuni introductive

Prin noțiunea de probă se înțelege orice produs sau material destinat examenului microbiologic.

Indiferent de natura probelor sau de tipul examenului solicitat recoltarea se efectuează după următoarele reguli:

- trimiterea probelor la laborator trebuie să se facă cât mai rapid şi în condiții de asepsie, respectând cât mai mult posibil condițiile de păstrare originale;
- fiecare probă se individualizează prin înscrierea pe banda de marcare de pe recipient a denumirii acesteia;
- este indicat să se recolteze cel puțin 100 g/probă;
- instrumentele de lucru reprezentate de linguri, pensule, spatule, foarfece din oțel inoxidabil etc., se sterilizează prin autoclavare (este periculoasă sterilizarea prin imersie în alcool sau la flacără);
- pentru probele lichide se pot utiliza recipienți ca: borcane de plastic, căni de metal etanşe etc. (se evită folosirea recipienților de sticlă);
- probele solide se recoltează în cutii, saci, sticle de plastic sau pachete sterile;
- probele sunt însoțite de un certificat în care se specifică ora şi data recoltării, precum şi a primirii acestora în laborator;
- recoltarea eşantioanelor relativ mici dintr-o cantitate mare de alimente trebuie să fie cât mai uniformă;
- trimiterea probelor la laborator se face în recipienți sterili, intacți;
- probele refrigerate se transportă la laborator în gheață la 0-4 °C; nu trebuie analizate la mai mult de 36 de ore de la recoltare;
- în cazul probelor lichide se va recolta şi o probă suplimentară pentru controlul temperaturii.

14.2. Recoltarea probelor de carne

Recoltarea probelor de carne se face in funcție de tipul produsului alimentar, după cum urmează:

- *carnea în carcase şi semicarcase*: se recoltează două cuburi de carne şi grăsime, unul de la suprafață şi altul din profunzime, cu latura de

minimum 8-10 cm şi un os lung;

- *organele*: se recoltează întregi sau porțiuni din acestea în pungi sau recipienți sterili în cantitate de minim 200 g;
- *carnea preambalată, carnea de pasăre, specialități de pasăre*: se recoltează 1 % din numărul pachetelor care alcătuiesc lotul, însă nu mai puțin de 5 pachete;
- *carnea de lucru* (din întreprinderile producătoare): se recoltează o probă de 500-1.000 g din fiecare lot dacă acestea sunt uniforme în privința caracterelor organoleptice; în caz contrar lotul se împarte în 3 subloturi:
  - cu caractere organoleptice normale;
  - cu uşoare modificări organoleptice;
  - cu caractere organoleptice evident modificate.

  Din fiecare sublot se recoltează o probă de 500-1.000 g.
- *carnea tocată*: se recoltează 200-300 g din fiecare ambalaj în proporție de 1% din numărul acestora (nu mai puțin de 2 şi nu mai mult de 5 ambalaje);
- *preparate din carne*: batoanele sau calupurile recoltate se secționează longitudinal realizându-se examenul organoleptic; cele două jumătăți constituie proba şi contraproba; dintr-una din jumătăți se recoltează (de la mijloc şi de la capete) 300-800 g şi se trimit la laborator;

14.3. Recoltarea probelor de conserve şi semiconserve

Recoltarea probelor de conserve se face în funcție de mărimea lotului, astfel:

Tabelul 14.1.

Mărimea lotului	Numărul de recipienți recoltați
Până la 1.000	2
1.001-5.000	5
5.001-10.000	10
10.001-50.000	20
50.001-150.000	30

Recoltarea semiconservelor se face pe loturi în funcție de mărimea acestora, astfel:

- până la 1.000 de recipiente se recoltează 2 recipiente;
- între 1.001-2.000 recipiente se recoltează 4 recipiente;
- între 2.001-3.000 recipiente se recoltează 6 recipiente;
- între 3.001-5.000 recipiente se recoltează 8 recipiente.

14.4. Recoltarea probelor de lapte şi produse din lapte

Dacă recoltarea se face în fermă se va ține cont şi de igiena adăpostului a mulgătorului şi a animalului. Recoltarea se face în recipienți sterili din fiecare sfert în parte eliminând primele jeturi. Pentru depistarea mamitelor streptococice recoltarea se va realiza de la începutul mulsului. Pentru tuberculoză de la sfârşitul mulsorii, iar pentru bruceloză de mijlocul mulsului.

În cazul produselor în ambalaje sub un kilogram proba va fi constituită din ambalajul original, iar în cazul celor peste un kilogram se recoltează aseptic 250-500 ml de lapte.

Recoltarea probelor de lapte praf se efectuează cu o sondă sterilă, îndepărtându-se stratul superficial pe o adâncime de 5-10 cm; în cazul ambalajelor mici se recoltează 1% din lot, iar a celor mari 10% din lot realizându-se o probă medie de 250 g.

Recoltarea probelor de lapte concentrat se realizează din 5% din numărul ambalajelor care formează lotul; acesta este format din maximum 2.000 l de lapte concentrat pentru ambalajele mari (bidoane, butoaie) şi maximum 3.000 l pentru cutii; recipienții se sterilizează prin flambare şi se deschid cu un perforator steril; se recoltează 25 g din care se cântăresc aseptic 10 g; prima diluție se face cu citrat de sodiu 1,25%.

Recoltarea probelor de smântână: lotul este format din maximum 500 kg (în cazul ambalajelor de desfacere) şi maximum 3.000 kg (la ambalajele de transport); în cazul smântânii ambalate în bidoane se deschid 5% din numărul acestora şi se recoltează 250 g; în cazul ambalajelor de transport se recoltează 1% din unitățile de ambalaj.

Recoltarea produselor lactate acide din ambalajele mici se recoltează 1%, iar din cele mari 10% (circa 500 ml), în recipienți sterili adecvați.

Recoltarea probelor de unt se face cu ajutorul unei sonde speciale atât de la suprafață cât şi din profunzime, recoltându-se câte 200 g din care se face o probă medie.

Recoltarea probelor de înghețată se realizează pe loturi; lotul reprezintă o şarjă de fabricație din acest sortiment; examenul bacteriologic se realizează pe minimum 3 ambalaje.

Recoltarea probelor de brânzeturi se realizează cu cuțitul, sonda sau se pot recolta bucăți întregi*; brânza telemea ambalată în butoaie*: se recoltează o bucată de la suprafață şi o bucată din profunzime, precum şi 200-300 ml de saramură; *brânza proaspătă de vaci* se recoltează prin deschiderea a 10% din ambalajele care formează lotul; dacă ambalajele sunt mari (bidoane, tăvi) se iau probe de la suprafață şi din profunzime şi

se formează o probă medie din care se recoltează 200-300 g, care se trimit la laborator; dacă ambalajele sunt mici (pachete de 300 g) se recoltează 2% din numărul unităților de ambalaj.

14.5. Recoltarea probelor de peşte

Se recoltează de la mijlocul şi din partea inferioară a ambalajului cel puțin câte 2 peşti sau două bucăți de peşte. În cazul peştilor peste 1 kg, se recoltează o fâşie transversală de carne (200-500 g), care se ambalează în hârtie cerată, se etichetează şi se sigilează păstrându-se în loc uscat, întunecos şi rece (maximum 8°C)- Probele se supun analizei în maxim 12 ore de la recoltare. Peştele afumat (lot maxim 500 kg) se prelucrează în acelaşi mod.

14.6. Ambalarea şi expedierea probelor recoltate din alimente

Ambalarea se realizează corespunzător fiecărui tip de probă, se sigilează şi se individualizează prin etichetare, trimițându-se în cel mai rapid timp la laborator.

14.7. Primirea şi prelucrarea probelor în laborator

Probele se înregistrează, se verifică şi se stabileşte conduita de lucru. Se controlează recipienții de recoltare, cum ar fi sacii sau sticlele de plastic, care trebuie să fie intacte. Se etichetează corect fiecare probă şi se individualizează. Este de dorit ca examinarea să se realizeze imediat după primirea probelor; dacă acest lucru nu este posibil probele se păstrează la frigider (probe perisabile, necongelate) sau la congelator (-20°c) în cazul probelor congelate.

Examenul de laborator se realizează prin îmbogățirea, izolarea şi identificarea agentului microbian presupus prin metode cât mai simple, precise şi rapide. Rezultatele obținute se consemnează în registrele de diagnostic ale laboratorului pe baza cărora se întocmeşte buletinul de analiză.

Determinarea numărului total de germeni (NTG)

NTG reprezintă un indicator microbiologic sanitar, care poate furniza informații asupra stării de contaminare a produsului sau obiectului analizat.

Metoda culturilor în plăci Petri pentru determinarea unităților formatoare de colonii (UFC).

Din materialul examinat se fac diluții zecimale astfel:

- ❖ la o cantitate de 50 g de probă se adaugă 450 ml de tampon fosfat Butterfield şi se amestecă bine într-un blender 2 minute; astfel se obține diluția 10^{-1};
- ❖ se folosesc pipete sterile, care se schimbă la fiecare diluție, transferând 10 ml din diluția 10^{-1} în diluția 10^{-2} şi aşa mai departe până la ultima diluție în 90 ml de diluant; numărul diluțiilor se stabileşte în funcția de condiția microbiologică urmărită;
- ❖ din diluțiile executate se fac însămânțări în plăci Petri introducând câte 1 ml din fiecare diluție într-o placă; rezultate mai exacte se obțin dacă se însămânțează câte 2 plăci pentru fiecare diluție;
- ❖ în fiecare placă se toarnă apoi peste suspensie 20 ml de agar topit şi răcit la 44-46°C;
- ❖ se omogenizează bine astfel încât bacteriile să fie repartizate uniform în mediul de agar, în vederea obținerii coloniilor izolate; se consideră că o colonie izolată reprezintă rezultatul multiplicării unei singure celule bacteriene;
- ❖ plăcile însămânțate se pun la termostat la 35°C, iar după 48 ± 2 ore se numără coloniile rezultate din fiecare diluție; se numără plăcile cu un conținut între 25 şi 225 de colonii;
- ❖ pentru a afla numărul de germeni se înmulțeşte numărul coloniilor existente într-o placă cu diluția respectivă; pentru obținerea unor rezultate mai precise se numără coloniile din mai multe plăci, se înmulțeşte fiecare cifră aflată cu diluția respectivă, iar apoi se face media aritmetică; rezultatul se exprimă prin UFC, care corespunde cu numărul coloniilor găsit pe unitatea de volum sau greutate din materialul examinat.

Alte metode acceptate

- metoda plăcilor spiralate;
- metoda gelului de pectină;
- metoda filmelor rehidratabile uscate.

Metode indirecte pentru determinarea NTG

1. Metoda cu albastru de metilen.

Principiul metodei: Se adaugă o cantitate mică de albastru de metilen la proba de lapte. Datorită acțiunii oxidoreducătoare a microorganismelor se va produce decolorarea laptelui. În funcție de intervalul de timp în care s-a produs decolorarea se apreciază indirect NTG din lapte.

Materiale necesare.

- ❖ eprubete cu diametrul de 2 centrimetri;
- ❖ baie de apă electrică sau termostat;
- ❖ soluție de albastru de metilen.

Tehnica de lucru: Într-o eprubetă sterilă se adaugă 1 mililitru soluție de albastru de metilen. Se adaugă 10 ml lapte din proba de analizat (încălzită în prealabil la 38-40ºC). Se omogenizează bine. Se introduce eprubeta în baie de apă sau în termostat la o temperatură de 38ºC.

Se urmăreşte decolorarea: după 20 minute; după 2 ore şi după 5 ore şi jumătate.

Determinarea se consideră încheiată, când întreaga probă de lapte s-a decolorat. În funcție de intervalul de timp, în care are loc decolorarea, laptele se poate împărți în patru clase de calitate:

2. Metoda cu resazurină

Principiul metodei: Resazurina este o oxazonă, care introdusă în lapte determină o colorație albastră.

Sub acțiunea microorganismelor este redusă în rezorufină de culoare roz-roşiatică şi apoi în dehidrorezorufină, care este incoloră.

Materiale necesare:

- ❖ eprubete sterile cu dop de cauciuc;
- ❖ pipete sterile de 1 ml şi de 10 ml;
- ❖ resozurină, soluție apoasă 0,05% (proaspăt pregătită cu apă sterilă);
- ❖ baie electrică sau termostat reglabil la 37ºC.

Tehnica de lucru: Se depune 1 ml de soluție de resazurină într-o eprubetă sterilă. Se adaugă 10 ml de lapte, din proba de analizat. Se închide eprubeta cu un dop de cauciuc, se omogenizează şi se introduce în baie de apă sau în termostat la 37ºC. După o oră, proba se omogenizează din nou şi se apreciază nuanța de culoare, în funcție de care laptele se încadrează, în 4 grupe.

3. Proba catalazei.

Cantitatea de catalază din lapte variază în funcție de încărcătura microbiană a acestuia şi de conținutul în leucocite. Prin dozarea catalazei se poate aprecia atât starea de sănătate a glandei mamare, cât şi condițiile de igienă în care a fost recoltat, manipulat şi păstrat laptele.

Principiul metodei: Se bazează pe proprietatea catalazei de a descompune apa oxigenată, eliberând oxigenul sub forma bulelor de gaz.

Materiale necesare:

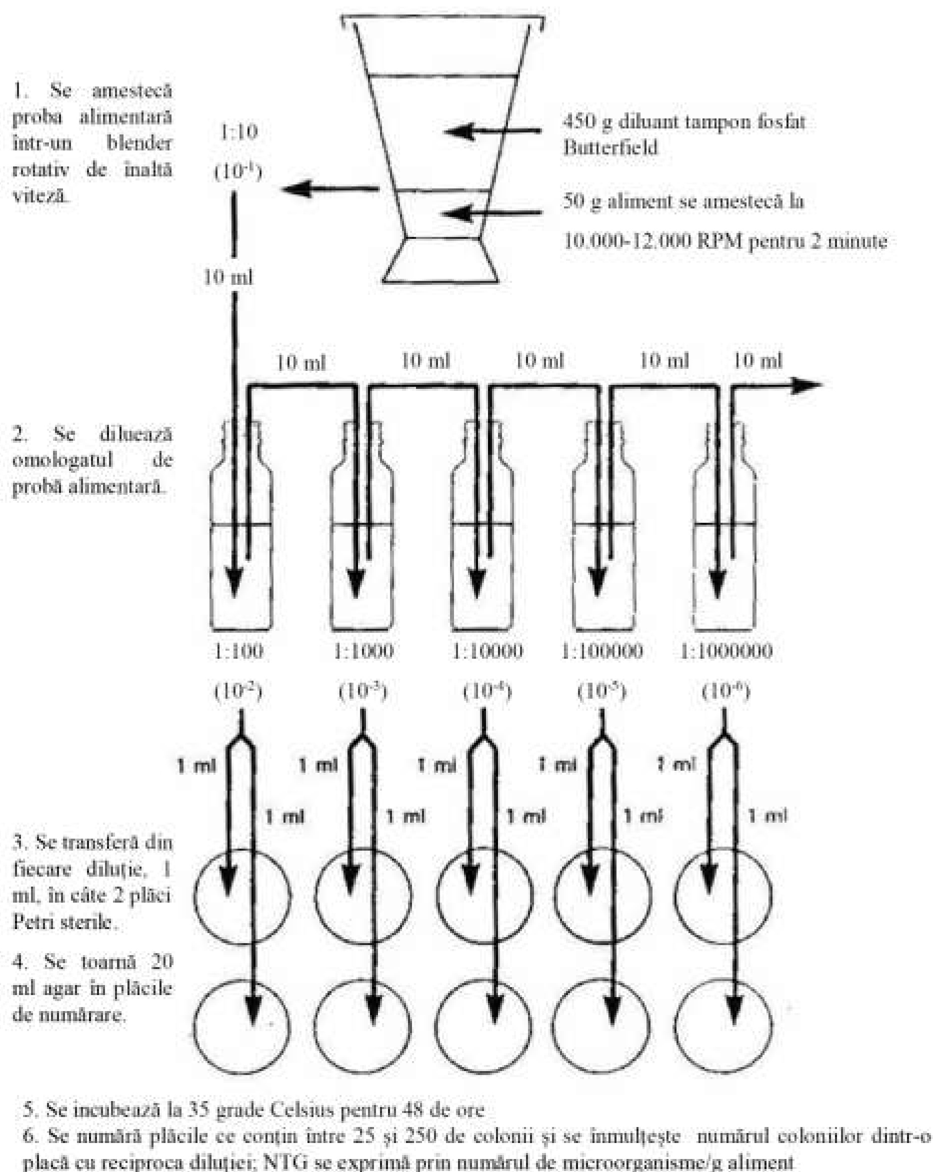
- ❖ apă oxigenată, soluție 3%;
- ❖ catalazometru (dispozitiv Lobek).

1. Laptele cu un conținut normal de germeni pune în libertate oxigen, care este capabil să disloce mai puțin de 1 ml apă.

2. Laptele cu un conținut mai mare de germeni (suspect) - eliberează oxigen, care dislocă 1- 3 ml apă.

3. Laptele cu germeni peste limita admisă (necorespunzător) - eliberează oxigen care dislocă mai mul de 3 ml de apă.

DETERMINAREA NUMĂRULUI TOTAL DE GERMENI (NTG)



5. Se incubează la 35 grade Celsius pentru 48 de ore

6. Se numără plăcile ce conțin între 25 și 250 de colonii și se înmulțește numărul coloniilor dintr-o placă cu reciproca diluției; NTG se exprimă prin numărul de microorganisme/g aliment

Capitolul 15
Tehnici de diagnostic de laborator

Tehnicile de diagnostic în laboratorul de microbiologie au drept scop izolarea şi identificarea speciilor bacteriene care se găsesc în alimente.

Probele de alimente o dată recepţionate şi triate calitativ sunt preluate de către microbiolog, care trebuie să hotărască:

- mediile de cultură şi metodele indicate pentru izolare;
- atmosfera, temperatura şi intervalul necesar pentru izolarea microorganismelor respective.

Metodele de investigaţie le putem împărţi în două mari grupe:

- metode directe;
- metode indirecte.

Prin metodele directe se urmăreşte depistarea rapidă a microorganismelor prin diverse examene, ca:

- efectuarea de preparate microscopice colorate şi necolorate;
- tehnici de biologie moleculară (de exemplu: reacţia PCR = Polymerase Chain Reaction);
- izolarea şi identificarea microorganismelor în cultură pură, precum şi efectuarea antibiogramei.

Metodele indirecte se referă la diagnosticul serologic, diagnosticul prin reacţii intradermice, etc.

Identificarea bacteriilor în laborator este posibilă după izolarea în cultură pură din proba de examinat şi studiul caracteristicilor morfobiologice ale acestora.

Examenul bacteriologic se desfăşoară în mai multe etape, astfel:

- recoltarea probelor;
- izolarea bacteriilor în cultură pură;
- identificarea bacteriilor în funcţie de caracteristicile lor morfologice, culturale, metabolice, antigenice, de patogenitate, etc., folosind teste corespunzătoare.

Selecţionarea testelor de diagnostic, în vederea stabilirii genului şi a speciei bacteriene se face pe baza rezultatelor obţinute la examenul caracterelor morfologice şi culturale.

Identificarea unui germen reprezintă de multe ori o operaţie dificilă şi în astfel de cazuri se face apel la determinatorul „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

Diagnosticul se trece în registrul laboratorului, la numărul sub care a fost înregistrată proba. Fiecare tulpină se individualizează fie printr-un

număr, fie printr-un simbol.

Pentru a avea condiții cât mai riguroase de sterilizare, în cursul diferitelor operațiuni în laboratoarele de bacteriologie, se recomandă ca lucrările să se efectueze în încăperi speciale, denumite boxe, cu restricții de circulație şi prevăzute cu lămpi cu ultraviolete, utilizarea hotelor simple sau a hotelor „laminar/linear flow”. În astfel de hote, aerul pătrunde linear spre operator şi este forțat să treacă printr-un prefiltru şi apoi printr-un sistem de filtre HEPA (high efficiency particulate air).

15.1. Aparatura utilizată în laboratorul de microbiologie

Recipienții utilizați în microbiologie trebuie să fie din sticlă neutră (pentru a nu altera pH-ul conținutului) şi suficient de groasă şi termorezistentă, pentru a evita spargerea lor şi contaminarea consecutivă a mediului.

Recipienții din sticlă boro-silicată (Pyrom, Turdaterm, Ryrex şi Jena) sunt cei mai indicați, pentru că prezintă o rezistență mare la şocurile termice (25-255°C) invers proporțională cu grosimea) şi eliberează cantități nesemnificative de alcali în mediu.

Sticla ordinară, calcosodică are o rezistență redusă la şocurile termice (între 40-90°C) şi eliberează alcali în soluții. Fiecare lot trebuie supus unui tratament de neutralizare.

Aparatura care nu poate lipsi din nici un laborator de microbiologie este reprezentată de:

● eprubete (pentru 2-4 ml de mediu); trebuie să aibă gura dreaptă, fără boruri;

● tuburi de centrifugă, cu fund rotund sau conic, din sticlă şi din material plastic;

● tuburi Durham: reprezentate de tubulețe de sticlă, care se introduc cu gura în jos, în mediul de cultură lichid, pentru a detecta formarea de gaz;

● plăci (cutii) Petri: plăcile din sticlă boro-silicată; nu se zgârie, sunt perfect plate şi uşor de stivuit, dar extrem de scumpe şi fragile; cele din sticlă calco-sodică sunt mai groase, mai rezistente şi mai ieftine; cele din material plastic, de unică folosință sunt ieftine, uşor de manipulat şi stivuit;

● pipete Pasteur – pot fi scurte sau lungi, cu calibrul de 6-7 mm, confecționate din sticlă sau polipropilenă. Se sterilizează ca şi pipetele gradate, ambalate în cutii de aluminiu;

● pipete gradate – au o capacitate de 1, 2, 5, 10 şi 25 ml. Se folosesc închise cu vată nehidrofilă la extremitatea de secțiune, pentru a preveni contaminarea lichidului pipetat cu microbi din propipetă;

● propipete – pot fi reprezentate de o pară de cauciuc adaptată la extremitatea de secțiune;

● lame şi lamele de microscop – lame cu margini palisate sau simple (mai ieftine).

Pentru colorarea preparatelor microscopice, folosim:

1. stative din sârmă anexate la tăvi metalice emailate;
2. cutii pentru băi de colorat.

Stative şi panere. Pentru tuburile şi flacoanele cu medii de cultură sunt indicate *stative autoclavabile din propilenă*, care reduc riscul spargerii eprubetelor, un dezavantaj al stativelor din metal.

Stativele din lemn sunt total neigenice şi dificil de decontaminat.

Coşurile din sârmă se folosesc numai pentru recipienții cu material neinfecțios.

Firul de însămânțare este confecționat din sârmă inoxidabilă, de platină sau crom nichel, cu grosime în funcție de consistența materialului microbian de manipulat. Este fixat într-un port fir din metal, care trebuie ținut perfect curat prin frecare periodică, uşoară, cu şmirghel fin, a extremității inferioare, pentru îndepărtarea materialului carbonizat. Port firul din sticlă este contraindicat.

Firul perfect drept. Este utilizat pentru însămânțări prin înțepare.

Ansa (firul buclat la o extremitate) – pentru însămânțarea în medii lichide şi pentru epuizarea inoculului în striuri.

Firul spatulat – pentru manipularea coloniilor microbiene, cu consistență fermă.

15.2. Sterilizarea

Sterilizarea reprezintă operația de îndepărtare a microorganismelor dintr-un spațiu sau de pe o suprafață delimitată cu ajutorul agenților fizici sau chimici.

Fizicianul englez John Tyndall a demonstrat că bulionul de cultură, încălzit, nu se alterează, dacă este păstrat în camere fără praf. Studiile sale au furnizat dovada că unii microbi din praf sau din aer prezintă o termorezistență extrem de mare, iar pentru distrugerea lor este necesar un tratament deosebit de energic.

Mai târziu, descoperirea şi descrierea detaliată a unor endospori bacterieni termorezistenți, de către bacteriologul german Ferdinand Cohn, au elucidat de ce căldura nu reuşeşte uneori să elimine complet microorganismele.

Sensul modern de „steril” (care implică absența oricărei forme de viață), a fost stabilit pornind de la această constatare. Capacitatea de sterilizare a obiectelor şi materialelor constituie o parte esențială a

microbiologiei, precum şi, a altor sectoare, ca medicina, industria, etc.

Încă de timpuriu, microbiologii au început să suspecteze că nu numai alterarea şi descompunerea sunt provocate de microorganisme, dar şi bolile infecțioase. Ei au mers până acolo, încât să susțină că însuşi corpul uman reprezintă o sursă de infecție.

Oliver Holmes (medic american) a observat că mamele care năşteau la domiciliu, prezentau mai puține infecții decât cele care năşteau în maternități, iar medicul ungur Ipraz Semmebicis a arătat, clar, că unele femei se infectau în saloanele maternităților, după ce erau examinate de medici, care veneau direct din camerele unde se făceau autopsiile.

Chirurgul englez Joseph Lister, a fost primul care a introdus tehnicile aseptice*, având ca obiectiv reducerea microbilor într-un mediu medical şi prevenirea infectării plăgilor. Această asepsie a constat în esență, în dezinfectarea mâinilor şi aerului, înainte de manoperele chirurgicale, cu substanțe chimice antiseptice puternice, ca fenolul. Aceste tehnici şi aplicarea căldurii, pentru sterilizare au devenit bazele controlului microbian prin metode fizice şi chimice, care mai sunt şi azi utilizate.

Reguli de asepsie în laborator:

- Se ordonează pe masa de lucru echipamentul strict necesar;
- Studentul se aşează comod pe scaun cu antebrațele complet pe blatul mesei, executând toate mişcările sub controlul vederii;
- Ansa se ține în mâna dreaptă, apucându-se ca pe un creion, de extremitatea opusă firului;
- În mâna stângă se ține recipientul în care se prelevă sau se introduce materialul manipulat, cât mai aproape de extremitatea inferioară;
- Se scoate dopul recipientului cuprinzându-l între auricular, inelar şi palma mâinii drepte;
- Se sterilizează, prin flambare gura eprubetei;
- Se introduce ansa în eprubetă pentru prelevarea şi depunerea materialului microbian. Se evită atingerea cu ansa a pereților recipientului;
- După retragerea ansei, se flambează gura recipientului şi se introduce dopul sau se înşurubează capacul;
- Se resterilizează ansa.

În laboratorul de microbiologie sterilizarea se obține prin tehnici bazate pe următorii agenți:

●● căldura uscată:
- încălzire la roşu;
- flambare;
- aer cald;
- incinerare.

●● căldura umedă:
  ● peste 100°C: autoclavare;
  ● la sau sub 100°C: tindalizare.
●● filtrare;
●● radiații ultraviolete;
●● sterilizare chimică prin oxid de etilen.

Sterilizarea prin încălzire la roşu este indicată pentru firul drept, ansa şi spatula de însămânțare.

Flambarea se foloseşte pentru sterilizarea capilarului eprubetelor Pasteur, a gurii eprubetelor şi flacoanelor.

Incinerarea presupune arderea, cu reducere la cenuşă. Este indicată pentru materialele din plastic, reziduuri organice.

Sterilizarea prin aer cald se realizează în etuvă la 160-180°C, timp de o oră. Timpul creşte peste o oră în cazul ambalajelor voluminoase sau a obiectelor, substanțelor care se încălzesc greu.

Este indicată în sterilizarea obiectelor de laborator din sticlă sau porțelan, instrumente chirurgicale, substanțe groase, pulberi termostabile.

Această metodă este contraindicată în sterilizarea unor soluții apoase, obiecte de cauciuc sau cu garnituri de cauciuc, seringi din sticlă cu metal, țesături, vată, bumbac, fibră sintetică, materiale contaminate de laborator.

Etuva este o incintă cilindrică sau paralelipipedică cu pereți dubli, din tablă termorezistentă. Rezistențele electrice şi un termostat permit menținerea constantă a temperaturii selectate, uniformizată în incinta de sterilizare printr-un sistem de ventilație. Obiectele de sterilizat se aşează în etuvă pe rafturi confecționate din sită metalică.

Sterilizarea prin căldură umedă se realizează cu ajutorul **autoclavelor**, în care vaporii de apă saturați realizează 115°C la 0,5 atmosfere, 121°C la 1 atmosferă şi 134°C la 2 atm.

Prezența aerului compromite acest tip de sterilizare.

Autoclavul este un cazan cu pereți rezistenți, în care după închiderea etanşă cu un capac masiv, fixat prin buloane, vaporii de apă se comprimă la presiunea necesară sterilizării.

Tindalizarea sau sterilizarea fracționată evită încălzirea la temperaturi peste 100°C, fiind destinată sterilizării unor medii de cultură, alimente, etc., care se degradează la temperaturi mai mari.

Sterilizarea fracționată constă în încălzirea materialelor de sterilizat la temperatura impusă de compoziția lor, timp de 30-60 de minute, la interval de 24 de ore, de trei ori consecutiv.

În prima zi de încălzire se distrug formele vegetative, ale bacteriilor, sporii rezistând. Aceştia se transformă (în intervalul de 24 de ore de

incubaţie la 37°C) în forme vegetative, care vor fi distruse prin încălzire, a doua zi. Încălzirea de a treia zi se face pentru distrugerea ultimelor forme vegetative, rezultate din germinarea sporilor.

În intervalul dintre încălziri, recipienţii cu substanţele supuse sterilizării se menţin la temperatura camerei, pentru germinarea sporilor.

Pasteurizarea ca şi **ultrapasteurizarea (uperizarea)** distruge numai formele vegetative, nefiind o sterilizare propriu-zisă. Se folosesc în industria alimentară (la sterilizarea laptelui, a berii, a sucurilor, etc).

Pasteurizarea constă în încălzirea lichidelor la temperaturi între 55°C şi 95°C, un timp variabil (la 65°C, 90 de minute, la 90°C, câteva secunde), iar ultrapasteurizarea în injectarea de vapori supraîncălziţi (150°C) în masa lichidelor destinate sterilizării.

Sterilizarea prin radiaţii ultraviolete se realizează cu ajutorul lămpilor germicide. Acestea reprezintă tuburi de sticlă specială, în care descărcările electrice într-o atmosferă cu vapori de mercur la joasă presiune generează radiaţii ultraviolete.

Viaţa de funcţionare este de aproximativ 100 de ore.

Instalarea lămpilor germicide este indicată pentru:

- reducerea încărcăturii microbiene a spaţiilor de lucru;
- constituirea unei bariere protectoare între aria cu animale inoculate, boxele de necropsie, etc. şi personalul de laborator sau animalele sănătoase.

15.3. Controlul eficacităţii sterilizării

Se realizează prin indicatori fizici (manometru, termometru), chimici şi biologici. Indicatorii fizici şi chimici ne dau indicaţii asupra timpului, cât s-a menţinut temperatura de sterilizare.

Indicatorii biologici: tuburi cu fire de bumbac impregnate cu spori de *Geobacillus* (*Bacillus*) stearothermophilus şi uscate (pentru etuve) sau fiole cu suspensie de acelaşi bacil (pentru autoclavare), prezintă o mare fidelitate.

Prezervarea sterilizării se realizează diferit, în funcţie de material.

Eprubetele şi flacoanele se sterilizează, prevăzute cu dopuri de vată şi tifon, protejate cu capişon de hârtie, sau aluminiu. Foarte eficientă este protejarea prin capac înşurubat.

Pipetele se sterilizează prevăzute cu filtru de vată, învelite individual în benzi de hârtie pergament sau grupate în cutii de tablă de aluminiu, prevăzute cu capac.

Plăcile Petri se sterilizează învelite, individual sau grupate în hârtie pergament. Mojarele şi pistilele se învelesc separat în hârtie.

Sterilizarea prin agenți chimici se poate realiza cu ajutorul:

● substanțelor dezinfectante, pe care le putem aplica numai pe suprafețe inerte din cauza efectelor iritante ori toxice (de exemplu: sublimat corosiv 1‰, formol 40%, sodă caustică, clorură de var);

● substanțelor antiseptice, care pot fi aplicate pe tegument, unele mucoase sau plăgi, având o toxicitate mai redusă (de exemplu: alcool medicinal, etilic 70%, tinctură de iod, apă oxigenată, permanganat de potasiu 0,1%, acid acetic 1%, cloramină, detergenți).

Niciodată această metodă nu se va utiliza pentru sterilizarea materialelor (instrumente, medii) destinate cultivării sau manipulării microbilor.

15.4. Transportul şi concervarea probelor

Transportul şi conservarea probelor se realizează după următoarele reguli:

● menținerea cât mai mult posibil a condiției microbiologice inițiale a probei, care constă în:

● supraviețuirea microbului infectant;

● inhibarea multiplicării microbilor contaminanți, pe baza nutrienților din prelevatul patologic sau distrugerea acestora;

● prevenirea răspândirii microbului infectant la personal şi în colectivitate.

Moartea microbilor poate fi provocată de razele solare, deshidratare, modificări de pH, autoliză, oxigen (în cazul germenilor anaerobi). De aceea, o dată recoltate, probele trebuie examinate în cel mai scurt timp posibil sau conservate prin refrigerare şi medii de transport adecvate.

● Refrigerarea se realizează la 0°C (în container izoterm cu gheață umedă) sau la 4°C (la frigider). Majoritatea microbilor patogeni supraviețuiesc în aceste condiții câteva ore necesare transportului, multiplicarea contaminanților fiind oprită. Foarte puține bacterii nu rezistă la refrigerare: meningococul, gonococul, *Haemophilus influenzae*.

● Mediile de transport asigură supraviețuirea microorganismelor prevenind disecarea, variațiile de pH, oxidarea şi autoliza. Cel mai frecvent sunt utilizate, în bacteriologie, mediile care conțin substanțe stabilizatoare non-nutritive: Cary-Blair, Amies sau Stuart. Pentru monitorizarea pH-ului se poate folosi un indicator (roşu fenol) când această condiție este critică pentru supraviețuirea unor microbi (virusuri, shigele etc.).

Microbii care se izolează pe culturi de celule sau embrioni de găină (virusuri, chlamidii) se transportă în medii cu antibiotice (penicilină, streptomicină, nistatină).

Când, însă, în acelaşi prelevat urmărim şi virusuri şi bacterii, proba va fi suspensionată în mediile de transport fără antibiotice, urmând ca acestea să fie adăugate diferențiat la prelucrarea probei în laborator.

O atenție aparte trebuie să acordăm bacteriilor anaerobe, astfel:

- dacă transportul şi examinarea se fac fără întârziere, cea mai accesibilă metodă este aspirarea probelor fluide în seringă etanşă, cu îndepărtarea imediată a bulelor de aer şi obturarea acului prin înțepare într-un dop steril;
- pentru probele biopsice şi tampoane sau dacă intervalul până la examinare se prelungeşte sunt indispensabile containere comerciale speciale (tuburi, flaconaşe, pungi), care conțin un sistem generator de dioxid de carbon, un agent reducător şi un indicator „redox" (resazurină sau albastru de metilen) pentru monitorizarea vizuală a anaerobiozei.

Containerele speciale cu atmosferă îmbogățită în dioxid de carbon şi mediu microaerofil sunt avantajoase pentru probele în care urmărim *Neisseria* sau *Campylobacter*.

Cei interesați de expedierea produselor microbiene prin poştă, trebuie să respecte exigențele de conservare şi securitate impuse de standarde recunoscute internațional.

15.5. Triajul de calitate al probelor

Are loc în două etape:

- controlul macroscopic, care se realizează prin înscrierea datelor în registrul de intrări sau introducerea acestora în terminalul unui computer. Se urmăresc:
    - consemnarea completă a datelor de identificare a probei, de pe eticheta recipientului şi din cererea de analiză;
    - consemnarea diagnosticului prezumptiv şi a datelor anamnetice esențiale;
    - recoltarea probelor sub terapie antimicrobiană;
    - formularea precisă a diagnosticului solicitat în raport cu diagnosticul prezumptiv şi natura prelevatului;
    - intervalul dintre prelevare şi înregistrare;
    - natura mediului de transport;
    - virajul indicatorilor de pH sau redox;
    - tipul şi starea ambalajului.
- controlul microscopic se realizează pe preparate umede sau colorate Gram.

15.6. Conduita generală a identificării bacteriilor

Identificarea şi clasificarea bacteriilor trebuie să folosească în mod obligatoriu un număr cât mai mare de caractere distinctive de ordin morfologic, biochimic, fiziologic, antigenic, ecologic etc., uşor de observat şi relativ stabile, independent de modificările mediului.

În identificarea unei bacterii trebuie să se țină seama de caracterele unitare (de exemplu: sporogeneza, fermentarea etc.).

Se va evita practicarea unui număr excesiv de teste, preferându-le pe cele care se efectuează rapid şi simplu.

Datorită faptului că, bacteriile izolate direct de la animale, plante sau din medii naturale apar rar în culturi pure, este necesară izolarea lor în culturi pure (axenice), lipsite de prezența altor microorganisme.

Caracterele morfologice şi tinctoriale reprezintă un criteriu preliminar, necesar pentru plasarea unei tulpini necunoscute într-o subdiviziune primară. În unele cazuri ele pot fi utilizate în practică drept un prim criteriu de diagnostic (de exemplu: prezența bacilului tuberculozei în spută).

Caracterele de cultură. Deşi variază în limite largi, în funcție de vârsta culturii, de natura mediului şi de temperatură şi pH, acestea pot furniza informații cu caracter ajutător pentru identificarea bacteriilor respective.

Caracterele biochimice şi fiziologice furnizează date importante în ceea ce priveşte capacitatea de a utiliza anumiți nutrienți; de a metaboliza anumite substraturi specifice ale unor enzime (fermentarea unor zaharuri, cu sau fără producere de gaz, modificări de pH evidențiate de un indicator colorat).

Condiții de cultivare. Pe baza acestui aspect se pot obține informații privind limitele de temperatură, pH, care permit multiplicarea, reacția la presiunea osmotică, relația cu oxigenul şi lumina.

Caracterele antigenice (serologice). Sunt deosebit de importante deoarece permit identificarea unui antigen (microorganism) necunoscut pe baza unui anticorp cunoscut, în diferite reacții serologice:

- de aglutinare;
- de precipitare;
- RFC;
- ELISA
- PCR
- de imunofluorescență, şi multe altele.

Caracterul de patogenitate a cărui manifestare depinde în primul rând de virulență. Acest caracter este relativ şi neunitar, deoarece virulența variază cu tulpina şi se poate atenua sau chiar pierde în culturi de laborator.

Pe de altă parte, eficacitatea acțiunii patogene depinde şi de receptivitatea individuală a gazdei, folosite pentru evidențierea ei.

Patogenitatea se testează prin inoculare experimentală la organisme sensibile, pe o cale adecvată.

Sunt luate în considerație numai rezultatele pozitive, deoarece cele negative pot fi datorate fie utilizării unei gazde neadecvate, fie unor condiții de inoculare nepotrivite.

Caracterele ecologice. Habitatul natural al microorganismelor şi relațiile lui în mediul natural cu alte forme de viață pot varia în funcție şi de alți factori decât cei proprii speciei date, precum şi pentru faptul că una şi aceeaşi specie bacteriană poate trăi în medii naturale foarte diferite.

Parametrii ecologici utili pentru caracterele unei specii sunt reprezentați de: temperatura optimă de creştere sau de patogenitate, temperatura tolerantă, intensitatea luminii, pH, simbioza cu unele microorganisme, etc.

Sensibilitatea la fag. Se testează stabilind activitatea unui set standard de fagi cunoscuți. Permite stabilirea de subdiviziuni în cadrul speciei (fagovar) cu importanță în epidemiologie, pentru determinarea sursei de infecție şi a căilor de transmitere.

Deoarece multe tulpini sunt lizogene, ele pot fi caracterizate prin tipizare fagică indirectă (lizogenotipie), adică prin detectarea şi identificarea fagilor temperați prezenți ca profag în genomul lor.

Cheile de identificare. Cheile de identificare conțin enumerarea caracterelor constante („caractere-cheie”) prezente sau absente totdeauna la un taxon dat.

Cea mai cunoscută cheie de identificare este cea elaborată de Skerman şi publicată în determinatorul lui Bergey.

Caracterele cheie pozitive sunt considerate markeri sau caractere de diagnostic.

Colecțiile de culturi. Menținerea tulpinilor bacteriene în colecții se poate realiza prin:

- *transfer activ* (în subculturi efectuate la intervale fixe, în funcție de particularitățile biologice ale speciei respective);
- *prin uscare* (pe diferite suporturi inerte ca: nisip, silicogel, etc.);
- *prin liofilizare* (uscare în vid urmată de congelare la temperaturi joase -30 – - 80°C);
- *prin crioprezervare* la -70°C – - 90°C, care asigură nivelul maxim de supraviețuire în timp.

Pentru fiecare specie microbiană nou apărută se recomandă păstrarea unei culturi pure, a tulpinii tip originare, cu o descriere completă, care să poată fi completatată cu noi caractere, pe măsură ce tehnicile de investigare se perfecționează.

Dacă tulpina este pierdută se recomandă înlocuirea ei cu o tulpină neotip, care îi seamănă foarte mult.

Păstrarea unui astfel de „specimen tip practicabil” este extrem de dificilă.

Din grupele de caractere enumerate se examinează un număr variabil, dar minimal pentru identificarea tulpinii, fiind foarte utile schemele de diagnostic şi cheile de identificare.

Pentru a definitiva identificarea unei tulpini, datele examenului bacteriologic, trebuie selectate, asamblate şi comparate. În acest scop se impune confruntarea caracterelor evidențiate cu datele prezentate în determinatoare, manuale, ghiduri.

Determinatoarele cuprind descrierea completă a speciilor bacteriene care prezintă interes pentru ramurile aplicative ale bacteriologiei. Sistemele de clasificare utilizate în determinatoare variază uneori de la un autor la altul, mai ales în ceea ce priveşte taxonii de rang superior (încrengătură, ordin).

Determinatorul cel mai folosit în lume, este lucrarea „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, a cărei primă ediție a apărut în 1923. În 1984, a apărut primul volum al manualului reeditat sub titlul „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”.

Indexurile conțin liste alfabetice ale tuturor denumirilor utilizate în prezent şi în trecut pentru bacterii.

Cataloagele de colecții cuprind liste alfabetice cu laboratoarele şi bacteriologii posesori de colecții de tulpini, pe specii bacteriene şi adresele acestora. În fiecare colecție bacteriană, tulpinile trebuie să posede o fişă individuală cu simbolul tulpinii, locul, data şi materialul din care a fost izolată, proprietățile ei morfologice, culturale, biochimice, antigenice, de patogenitate, etc.

Tabelul 15.1

Taxonii de rang superior ai speciilor bacteriene importante

Clasă/ Subclasă	**Ordin/ Subordin**	**Familie (nr. genuri)**	**Gen (nr. de specii)**
Cl. Bacilli	Ord. Bacillales	Staphylococcaceae (5)	Staphylococcus (41)
		Bacillaceae (17)	Bacillus (184)
		Listeriaceae (2)	Listeria (8)

	Ord. Lactobacillales	Lactobacillaceae (3)	Lactobacillus (130)
		Streptococcaceae (2)	Streptococcus (83) Lactococcus (5)
		Enterococcaceae (5)	Enterococcus (35)
		Leuconostocaceae (3)	Leuconostoc (19)
Cl. Clostridia	Ord. Clostridiales	Clostridiaceae (23)	Clostridium (180) Acetivibrio (4)
Cl. Actinobacteria Scl. Actinobacteridae	Ord. Actinomycetales Srd. Actinomycineae	Actinomycetaceae (5)	Actinomyces (37) Actinobaculum (3) Arcanobacterium (6)
	Ord. Actinomycetales Srd. Corynebacterineae	Corynebacteriaceae (1)	Corynebacterium (89)
		Nocardiaceae (2)	Nocardia (73) Rhodococcus (37)
		Mycobacteriaceae (1)	Mycobacterium (118)
	Ord. Actinomycetales Srd. Micrococcineae	Micrococcaceae (9)	Micrococcus (10)

Tabelul 15.2.

Taxonii de rang superior ai speciilor bacteriene importante

Clasă/ Subclasă	**Ordin/ Subordin**	**Familie (nr. genuri)**	**Gen (nr. de specii)**
Cl. Gammaproteobacteria	Ord. Enterobacteriales	Entero-bacteriaceae (44)	Escherichia (7) Klebsiella (12) Morganella (1) Plesiomonas (1) Proteus (8) Providencia (6) Salmonella (9) Serratia (13) Shigella (4) Yersinia (13)
	Ord. Pasteurellales	Pasteurellaceae (7)	Pasteurella (22) Actinobacillus (18) Haemophilus (23) Lonepinella (1) Mannheimia (5)
	Ord. Thiotrichales	Francisellaceae	Francisella (3)

Clasă/ Subclasă	Ordin/ Subordin	Familie (nr. genuri)	Gen (nr. de specii)
		(1)	
	Ord. Pseudomonadales	Pseudomona-daceae (10)	Pseudomonas (161) Cellvibrio (7)
	Ord. Vibrionales	Vibrionaceae (8)	Vibrio (77)
	Ord. Aeromonadales	Aeromonadaceae (4)	Aeromonas (20)
	Ord. Cardiobacteriale	Cardio-bacteriaceae (3)	Dichelobacter (1)
	Ord. Legionellales	Legionellaceae (1)	Legionella (50)
		Coxiellaceae (3)	Coxiella (1)
Cl. Betaproteobacteria	Ord. Burkholderiales	Burkholderiaceae (10)	Burkholderia (42)
		Alcaligenaceae (11)	Bordetella (8)
Cl. Alphaproteobacteria	Ord. Rhizobiales	Brucellaceae (3)	Brucella (6)
	Ord. Rickettsiales	Rickettsiaceae (2)	Rickettsia (23) Orientia (1)
Cl. Spirochaetes	Ord. Spirochaetales	Leptospiraceae (2)	Leptospira (13) Leptonema (1)
Cl. Spirochaetes	Ord. Spirochaetales	Spirochaetaceae (9)	Borrelia (32) Treponema (23) Cristispira (1) Brevinema (1)
		Serpulinaceae (2)	Brachyspira (5) Serpulina (6)
Cl. Epsilonproteobacteria	Ord. Campylo-bacterales	Campylo-bacteriaceae (4)	Campylo-bacter (25)
		Helicobacterace ae (4)	Helicobacter (23)
Cl. Deltaproteobacteria	Ord. Desulfo-vibrionales	Desulfo-vibrionaceae (3)	Lawsonia (1)
Cl. Fusobacteria	Ord. Fusobacteriales	Fusobacteriacea e (7)	Fusobacterium (20)
Cl. Mollicutes	Ord. Mycoplasmatales	Mycoplasma-taceae (4)	Mycoplasma (121) Eperythrozoon (5) Ureaplasma (7)
Cl. Chlamydiae	Ord. Chlamydiales	Chlamydiaceae (2)	Chlamydia (5) Chlamydophila (6)

Capitolul 16
Medii de cultură, reactivi şi diluanţi utilizaţi în diagnosticul de laborator

16.1. Caractere generale

Mediile şi reactivii descrişi în acest capitol au fost evaluaţi ca eficienţi pentru utilizarea lor în anumite metode. Aceste medii şi reagenţi se vor folosi exact cum este specificat în rețetă, introducerea oricărei modificări (chiar aparent minoră), poate afecta rezultatele obținute prin metoda respectivă.

Pentru utilizarea diferitelor medii de cultură se vor respecta următoarele reguli generale:

- bulionul de carne se poate înlocui cu extract de carne concentrat în proporție de 3g extract concentrat la 1000 ml bulion;
- dacă se folosesc fibrele de agar pentru prepararea mediilor solide, acestea în prealabil se înmoaie în apă distilată;
- prin bulion de carne (dacă nu există altă specificație) se înțelege bulionul obținut din carnea de bovine sau cabaline;
- dacă nu se menționează metoda de sterilizare, aceasta se va realiza prin autoclavare. De obicei, sterilizarea se va realiza la 121°C, timp de 15-20 de minute (pentru mediile care nu conțin zaharuri) şi respectiv la 115°C, 15-20 de minute (pentru mediile care au în compoziția lor zaharuri).
- prepararea oricărui mediu de cultură se va realiza după următoarea rețetă generală:

1. ingredientele din rețetă se adaugă pe rând (sub agitare), în apă distilată sau bulion de carne încălzite la 15-60°C;
2. se supun fierberii până ce se dizolvă complet (câteva minute);
3. se ajustează pH-ul;
4. se filtrează prin vată (în baloanele cu zaharuri, dacă este cazul);
5. se agită bine, pentru dizolvare;
6. se ajustează din nou pH-ul (dacă este necesar), având în vedere că acesta de obicei scade la o valoare cu 2-6 diviziuni (după caz), decât valoarea pH-ului final, specificat în rețetă;
7. se verifică dacă sterilizarea s-a realizat corect prin incubare la 35-37°C, timp de 24-48 de ore şi se înlătură recipienții cu medii

infectate.

După preparare, mediile sterilizate se păstrează în locuri întunecoase şi răcoroase.

Deşi, acest capitol prezintă formulele tuturor mediilor folosite în metodele descrise în manual, se preferă utilizarea mediilor deshidratate din comerţ, pentru uniformitatea metodei şi a scurtării timpului efectiv de lucru al analizatorului.

În cazul în care nu există un mediu comercial, acesta trebuie preparat din componentele sale individuale. Climatul cu umiditate mare poate provoca întărirea rapidă a mediilor deshidratate, putând afecta astfel performanțele metodei. În plus mediile alcaline pot absorbi dioxidul de carbon şi pot modifica pH-ul. Ori de câte ori este posibil, mediile trebuie furnizate cu data expirării pe recipient. Dacă aceasta nu este specificată, mediile nu se folosesc mai mult de un an de la primirea lor în laborator. Cele vizibil alterate prin formarea de cocoloaşe sau acumularea de umezeală trebuie aruncate.

Compuşii chimici sunt folosiți pe scară largă în compoziția mediilor, ca agenți selectivi, ca indicatori şi coloranți în diferite proceduri microbiologice. Datorită faptului că impuritățile chimice pot, fie să inhibe, fie să stimuleze creşterea microorganismelor sau pentru că pot produce o reacție nedorită, trebuie folosite numai substanțe chimice care îndeplinesc specificațiile unei organizații de certificare.

Spre deosebire de majoritatea mediilor deshidratate, substanțele chimice prezintă foarte rar marcată data de expirare.

16.2. Medii de cultură folosite în diagnosticul de laborator

Mediile de cultură reprezintă amestecuri de substanțe organice şi anorganice, ce asigură microorganismelor ce dorim să le cultivăm condiții optime pentru dezvoltare.

După Răducănescu H., mediul de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv, steril, care permite dezvoltarea şi studiul unui microb în afara nişei sale ecologice naturale.

Gama mediilor de cultură utilizate în microbiologie s-a extins considerabil, datorită:

- creşterii numărului de entități taxonomice, care trebuiesc izolate şi identificate;
- cunoaşterea factorilor nutritivi proprii, îndeosebi a grupelor taxonomice nou descrise;
- extinderii numărului de caractere fenotipice definitorii, cerință impusă de exigențele taxonomice moderne;
- exigențele de lucru impuse laboratoarelor de diagnostic.

Compoziția mediilor de cultură variază de la câțiva compuşi organici foarte simpli, până la o listă complexă de compuşi organici şi anorganici.

Manualul Difco (Digestive Ferments Company) fondat în 1895, enumeră aproximativ 500 de medii folosite în laboratoarele moderne de microbiologie.

Datorită exigenței produselor comerciale gata pentru folosire, mediile de cultură, în ziua de azi, se prepară foarte uşor. Nu însă, aceeaşi era situația şi în trecut.

O cameră de preparare a mediilor avea aspectul unui „hibrid" între o bucătărie şi laboratorul unui alchimist.

O carte de referință, care trece în revistă mediile de cultură până în anul 1930, poartă titlul de „O compilare de medii de cultură pentru cultivarea microorganismelor", de Levine şi Shoenlein şi conține 7000 de rețete.

O combinație fantastică de materii prime se adăugau (şi uneori se mai adaugă) preparatelor, unele forme fiind extrem de complexe. Nu era ceva neobişnuit ca pentru un singur mediu să fie necesare 25 de faze de preparare. Compozițiile mediilor par să nu fi fost limitate decât de imaginația „bucătarului". În rețete apar numeroase produse animale neconvenționale, cum ar fi: oase, cartilaje, placentă, plămân, slănină, carne tocată de vită, testicule, spermă, puroi, fecale, urină.

Materialele vegetale, care constituie de asemenea o sursă foarte bună de substanțe nutritive, erau măcinate, tăiate, tocate, pasate, filtrate şi gătite. O listă parțială sugerează o adevărată grădină: cartofi, morcovi, spanac, ceapă, mazăre, fructe (banane, prune), ierburi (paie, fân) şi zeci de diverse semințe.

Produse ca sucul de tomate, macaroane, cafea, condimente, unt şi bere şi-au avut, de asemenea, locul în unele amestecuri.

Nici o sursă imaginabilă nu a fost omisă, incluzând componente ciudate ca: pământ, bălegar, cărămizi, cărbuni, rumeguş, cenuşă de lemne, scame, cuie ruginite, azbest, arsenic şi cianură.

Pentru a putea fi folosite în cultivarea bacteriilor, mediile de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să conțină substanțe nutritive necesare metabolismului bacterian;
- să aibă un pH necesar dezvoltării bacteriei respective;
- să corespundă particularităților fiziologice ale bacteriilor, mai ales în funcție de tipul respirator;
- să fie steril.

Mediile de cultură se prepară din ingrediente special destinate acestui scop, cum ar fi:

- ingrediente rezultate în urma hidrolizei acide a unor produse de origine animală, vegetală sau microbiană (extract de carne de bovine,

hidrolizat de cazeină, extract de drojdie);

● săruri minerale: în compoziția unui mediu intră aproape întotdeauna clorura de sodiu 0,5-0,7 %;

● agarul este mediul solid şi se găseşte în comerț sub formă de agar fibre sau pudră, fiind reprezentat de o algă marină (Gelidium corneum) din mările Japoniei.

Descoperirea agarului. Bacteriologii au realizat încă din timpurile trecute, avantajul creşterii bacteriilor în colonii separate, față de creşterea lor în bulioane şi infuzii. În acest scop ei au avut nevoie de un mediu care să fie relativ solid pentru cultivarea bacteriilor şi care, în acelaşi timp să furnizeze nutrienții necesari acestora.

În trecut, se foloseau felii de cartof sau gelatină sterilizată, însă acestea lăsau mult de dorit, nefiind extrem de eficace în acest sens. Cartofii aveau un conținut limitat de nutrienți, iar gelatina îşi pierdea soliditatea la temperaturi mai calde, putând fi digerată de multe categorii de microorganisme.

Bacteriologul german **Walther Hesse** a studiat microbii din aer, fiind dezamăgit de rezultatul derutant al culturilor în gelatină. Înțelegând necesitatea găsirii unui substituent al gelatinei, soția sa Fanny, i-a sugerat să folosească o substanță numită agar. Agarul era folosit tradițional în Malaezia pentru prepararea jeleurilor şi îngroşarea supelor, fiind un agent de solidificare aproape perfect. Prin această descoperire importantă, Hesse a reuşit un salt imens în istoria preparării mediilor de cultură, agarul fiind folosit şi în zilele noastre.

● apa, reprezintă sediul reacțiilor chimice şi intră în compoziția tuturor mediilor de cultură sub diferite forme (distilată, bidistilată, deionizată, de robinet, de izvor), în funcție de necesitățile bacteriilor;

● alte ingrediente care folosesc la prepararea unor medii speciale sunt reprezentate, de exemplu, de: extractul de malț, extractul de larve de albine, ser sangvin, sânge, vitamine, antibiotice, indicatori de pH etc.

16.3. Prepararea mediilor de cultură

Se realizează conform unor rețete, a căror compoziție variază în funcție de exigențele nutritive ale bacteriei cultivate.

Etapele de preparare a celui mai simplu mediu de cultură (bulionul) sunt următoarele:

● mediul original se prepară din macerat de carne, obținut din 500 grame de carne, la care se adaugă 1000 mililitri de apă;

● se lasă o noapte la temperatura camerei, se fierbe şi se filtrează prin vată;

● la lichidul obținut se adaugă peptona (10‰), clorura de sodiu (5‰);

● se ajustează pH-ul prin adăugarea de soluție normală de hidroxid de sodiu;

● se filtrează din nou prin hârtie de filtru;

● se repartizează în recipiente de sticlă, care se astupă cu dopuri de vată;

● se sterilizează 30 de minute la 115°C.

Maceratul de carne poate fi substituit cu extractul de carne, sub formă de pulbere purificată şi standardizată, produsă de diferite firme internaționale (Merck, Difco, Bacto) sau de institute de produse biologice din țara noastră.

Prepararea unui mediu solid (agar) se realizează astfel:

● la 1000 mililitri bulion se adaugă 17-30 grame agar, de preferat pulbere;

● mediul se repartizează în eprubete şi se sterilizează;

● dacă solidificarea se produce în poziție înclinată se obține agar înclinat, iar în poziție verticală se obține agar drept.

Mediile cu ser se prepară din medii uzuale (bulion, agar), la care se adaugă ser normal (de obicei, de cal), în proporție de 1/10.

16.4. Clasificarea mediilor de cultură

Mediile pot fi clasificate după trei niveluri principale:

- forma fizică;
- caracteristicile chimice;
- tipul funcțional.

Criterii de clasificare:

1. <u>După consistență.</u>

● *medii lichide* – tind să curgă liber când vasul este înclinat; bulioane sterile, lichide lăptoase (lapte cu albastru de metilen, lapte cu turnesol), soluții nutritive, thioglicolatul lichid (în cultivarea bacteriilor anaerobe);

● *medii semisolide* – nu devin lichide la temperatura obişnuită a camerei, prezentând o consistență gelatinoasă, datorită faptului că ele conțin agar sau gelatină, care le întăreşte într-o oarecare măsură, dar nu produc un substrat tare; se folosesc pentru observarea mişcării bacteriilor şi pentru păstrarea bacteriilor în colecții bacteriene; la încălzire se lichefiază.

Exemple: mediul pentru testarea mobilității şi mediul SIM, ce conțin 0,3-0,5% agar. Mediul SIM mai este folosit şi pentru testarea producerii de hidrogen sulfurat şi reacția indolului.

Tot în această categorie se încadrează şi agarul cu cistină tripticază (CTA) şi mediile de transport.

● *mediile solide* – prezintă o suprafaţă tare, pe care celulele pot forma colonii separate, fiind vitale în izolarea şi subcultivarea bacteriilor şi fungilor. Ele se prezintă sub două forme:

- lichefiabilă;
- nelichefiabilă.

Mediile solide lichefiabile (medii solide reversibile) conțin un agent de solidificare care este termoplastic (modificat fizic în funcție de temperatură). Cel mai folosit este agarul, un polizaharid complex, izolat din alga roşie *Gelidium*.

Agarul prezintă numeroase avantaje. Este solid la temperatura camerei şi la temperatura de incubare (40-45°C) şi se lichefiază la temperatura de fierbere a apei (90-100°C). O dată lichefiat nu se resolidifică, decât după ce se răceşte la 42°C, ceea ce permite ca să fie turnat în eprubete sau în plăci Petri sub formă lichidă, la temperaturi care nu vor dăuna microbilor sau manipulatorului (45-50°C). Agarul este flexibil şi modelabil, reprezentând un cadru de bază pentru menținerea umidității şi a nutrienților, deşi, pentru marea majoritate a microorganismelor, el însuşi nu reprezintă un nutrient utilizabil. Enzimele bacteriene nu sunt capabile să-l digere (degradeze).

Exemple: Orice mediu, care conține de la 1% până la 5% agar, conține de obicei acest cuvânt în denumirea sa.

2. <u>După compoziția chimică, se împart în:</u>

- *medii naturale;*
- *medii sintetice;*
- *medii semisintetice.*

Mediile sintetice. Mediile a căror compoziție este determinată chimic, se numesc medii sintetice. Conțin compuşi organici şi anorganici cu un grad mare de puritate şi un conținut molecular specificat printr-o formulă exactă. Astfel de medii sunt foarte utile în cercetare şi culturi celulare, în care nevoile nutriționale ale organismelor testate sunt cunoscute.

Mediile naturale (empirice). Conțin cel puțin o componentă care nu poate fi determinată chimic (un compus care nu este foarte pur, simplu şi nu poate fi determinat printr-o formulă chimică).

Exemple: medii cu sânge, ser şi extracte de carne, lapte, extract de levuri, boabe de soia digerate, glucide vegetale complexe, cartof glicerinat, peptonă.

Peptona este o proteină parțial digerată, bogată în aminoacizi, folosită deseori ca sursă de carbon şi azot.

3. <u>După frecvența şi scopul utilizării în laborator</u> – se împart în medii uzuale şi medii speciale.

Mediile uzuale sunt folosite frecvent în laborator, fiind destinate cultivării unui spectru larg de microbi. De regulă, sunt medii naturale şi conțin un amestec de nutrienți care pot stimula în aceeaşi măsură creşterea microbilor patogeni şi nepatogeni.

Exemple: agarul şi bulionul nutritiv, agarul cu sânge, agarul cu tripticază soia (TSA).

Mediile speciale sunt reprezentate de:

● *medii de îmbogățire* – care conțin nutrienții de bază, asemănătoare cu mediile uzuale, fiind îmbogățite cu sânge, ser, factori de creştere.

Exemple: *Stc. pneumoniae* se cultivă pe agar cu sânge; Neisseria, pe mediul agar şocolat (agar cu sânge fiert); *H. influenzae* se cultivă pe mediul Fildes, care conține sânge de oaie digerat.

● *mediile selective* conțin un agent (sau mai mulți), care inhibă creşterea unui anumit microb A, lăsând să se dezvolte microbul B, ca urmare, stimulează sau selecționează pentru creştere grupul B.

Exemple:

- mediul MSA (manitol salt agar) conține 7,5% NaCl, care este inhibitor pentru majoritatea agenților patogeni, cu excepția genului Staphylococcus;
- agar Mac Conkey, agar cu eozină, albastru de metilen (EMB), conțin săruri biliare, care inhibă dezvoltarea majorității bacteriilor Gram pozitive.

Coloranții, ca albastrul de metilen şi cristal violet inhibă, de asemenea, dezvoltarea majorității bacteriilor Gram pozitive.

Alți agenți cu proprietăți selective sunt reprezentați de antibiotice, acizi sau oxigen (adăugat sau îndepărtat).

● *medii de identificare (de diagnostic diferențial)*. Pe aceste medii pot creşte mai multe tipuri de microorganisme, însă datorită aspectului lor variat, se pot diferenția unele de altele. Diferențele constau în variații ale coloniilor în ceea ce privesc culoarea, dimensiunile şi modificării de culoare a mediilor.

De exemplu, când o substanță adăugată în mediul de cultură este vizibil modificată de microbul A, dar nu şi de microbul B, A va avea un aspect diferit de B, în prezența substanței respective.

Exemple: coloranții şi substanțele hidrocarbonate (zahărul) pot servi ca agenți diferențiali, prin faptul că aceştia modifică culoarea, ca răspuns la modificările de pH. Agarul Mac Conkey conține lactoză şi roşu neutru, un colorant care este galben, când este neutru şi roz sau roşu, când e acid. *E. coli*, care fermentează lactoza cu producere de acid formează colonii roşii până la roz, iar Salmonella, care nu fermentează lactoza îşi păstrează

culoarea naturală galbenă.

● *medii de reducere* – conțin o substanță care absoarbe oxigenul sau încetinește pătrunderea acestuia într-un mediu inducând astfel potențialul de oxidoreducere. Exemple de agenți reducători sunt acidul thioglicolic, acidul ascorbic, cisteina.

● *mediile de transport* – sunt folosite pentru transportul specimenelor mai sensibile (care mor repede) sau care urmează să fie transportate pe o distanță mai mare, ce necesită un timp mai lung până la analiza lor chimică.

Exemple: Stuart, Amies – conțin săruri, tampoane și absorbanți, pentru prevenirea distrugerii celulelor de către enzime, de modificările pH-ului sau substanțe toxice și nu conțin nutrienți pentru stimularea creșterii.

● *Medii de conservare* – geloză moale.

● *Medii de testare* – pentru testarea eficienței medicamentelor antimicrobiene de către fabricanții de medicamente, pentru evaluarea efectului dezinfectantelor, antisepticelor, cosmeticelor și conservanților asupra creșterii microorganismelor.

Medii de urmărire. Sunt folosite pentru calcularea numărului de microorganisme din lapte, apă, alimente, sol și alte eșantioane.

Majoritatea rețetelor de preparare prezentate mai jos sunt recomandate de farmacopeea USA-1992.

1. <u>Bulion nutritiv simplu.</u>

Bulion de carne	1000 ml
Peptonă	10 g
Clorură de sodiu	5 g

pH = 7,4

2. <u>Agar nutritiv (geloză)</u>

Bulion nutritiv	1000 ml
Agar	15-20 g

pH = 7,4

3. <u>Bulion nutritiv glucozat</u>

Bulion de carne	1000 ml
Peptonă	10 g
Clorură de sodiu	5 g
Extract de drojdie	5 g
Glucoză	10 g

pH = 7,4

Se repartizează câte 8-10 ml în eprubete și se sterilizează.

4. Bulion VF (viande = carne; foie = ficat)

Ficat de vițel	250 g
Carne de vițel	250 g
Apă de la robinet	1000 ml

- ficatul şi carnea se toacă mărunt şi se fierb 20 minute;
- se filtrează prin tifon;
- fragmentele de carne şi ficat rămase în tifon se spală de 4-5 ori cu apă distilată, se usucă şi se repartizează în tuburi, în cantitate de circa 1-3 grame.
- lichidul obținut după filtrare se completează cu apă de la robinet la volumul inițial;
- se adaugă 5 g peptonă şi 5 g clorură de sodiu;
- se ajustează pH-ul la 8;
- se autoclavează 20 minute la 120°C;
- se adaugă 2% glucoză;
- se repartizează câte 6 ml în tuburi, în care s-au introdus în prealabil câte 3 g de carne şi ficat;
- se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 115°C;
- înainte de utilizare mediul se regenerează prin fierbere;

5. Geloză Veillon

Bulion nutritiv	1000 ml
Agar	3 g
Glucoză	5-10 g
Azotat de potasiu	1-2 g

pH = 7,4

Se repartizează în eprubete înalte, cu diametrul cât mai mic, astfel încât mediul să ocupe 3/4 din înălțimea acestora. Se sterilizează.

6. Agar nutritiv glucozat

La bulionul nutritiv glucozat se adaugă 1,5-2% agar. Se fierbe pentru topirea şi omogenizarea agarului. Se filtrează prin vată şi se repartizează în recipienți adecvați. Se sterilizează prin autoclavare.

Pentru agarul glucozat înclinat se repartizează înainte de sterilizare 5-6 ml de mediu în eprubete, care se înclină imediat după scoaterea din autoclav.

7. Agar cu extract de drojdie-glucoză-gelatină (Frazier) (Mediu pentru izolarea şi identificarea fungilor ce contaminează produsele alimentare)

Triptonă	5 g

Extract de drojdie	3 g
Gelatină	4 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,0

Se repartizează câte 12-15 ml în eprubete. Se sterilizează.

8. Agar cu triptonă-extract de drojdie-glucoză (plate count agar) (PCA) (mediu pentru determinarea numărului total de bacterii aerobe din produsele alimentare (NTG)

Triptonă	5 g
Extract de drojdie	2,5 g
Glucoză	1 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,0

9. Agar cu triptonă-extract de drojdie-glucoză-lapte (TEGA)

Triptonă	5 g
Extract de drojdie	2,5 g
Glucoză	1 g
Agar	15-20 g
Apă distilată	1000 ml

pH=7,1

Se repartizează câte 90 ml în baloane de 200 ml. Se sterilizează. În momentul folosirii la 90 ml mediu de bază topit şi răcit la 50°C. Se adaugă în condiții aseptice 10 ml de lapte degresat, sterilizat, încălzit la 50°C. După răcire mediul prezintă un aspect alb-opac.

10. Bulion nutritiv cu ser

La bulionul nutritiv cu pH 7,4 se adaugă ser sanguin de bou sau cal în proporție de 1/10. Se omogenizează.

11. Agar nutritiv cu ser

La agarul nutritiv cu pH 7,4, topit şi răcit la 50°C se adaugă ser sanguin de bou sau de cal în proporție de 1/10. Se omogenizează.

12. Agar cu lapte

La geloza nutritivă repartizată în eprubete, sterilizată şi lichefiată, se adaugă lapte smântânit, sterilizat, în cantitate de 1-2 ml, la 10 ml de mediu. Amestecul se toarnă în plăci Petri, în care se introduce inoculul. Mediul prezintă un aspect alb-opac.

Interpretare. Coloniile de bacterii proteolitice peptonizează cazeina din lapte, iar mediul din jurul lor se clarifică.

13. Lapte turnesolat

Se fierbe laptele. Se centrifughează timp de 15 minute la 3.000 rpm pentru îndepărtarea grăsimii. Se repartizează în eprubete şi se sterilizează prin autoclavare 15 minute la 105-106°C.

Pentru a urmări modificările de pH ale mediului se foloseşte lapte turnesolat (se prepară la fel ca şi laptele degresat), la care se adaugă soluție apoasă, sterilă de turnesol 10%, până la obținerea culorii albastru-violet.

Eprubetele cu mediu se însămânțează cu tulpina de testat şi se incubează 24-48 de ore la 37°C.

Interpretare.

- are loc dezvoltarea coloniilor bacteriene, fără modificarea mediului de cultură;
- dezvoltarea coloniilor bacteriene poate fi însoțită de coagularea laptelui, fără acidifiere (mediul nu îşi modifică culoarea);
- poate avea loc dezvoltarea coloniilor bacteriene, însoțită de coagulare şi acidifiere (decolorarea mediului);
- dezvoltarea coloniilor bacteriene poate fi însoțită de alcalinizare, datorită producerii de amine şi amoniac (mediul îşi menține culoarea).

14. Ser coagulat

Se recoltează aseptic, ser sanguin (de bovine sau cabaline). Se repartizează câte 5-6 ml în eprubete sau câte 12-15 ml, în plăci Petri şi se coagulează, în poziție înclinată, în etuvă la 70-75°C. După coagulare, mediul prezintă o culoare alb-cenuşie.

Interpretare. Dacă are loc proteoliza mediul se va lichefia şi vor apare depresiuni pe suprafața lui în jurul şi în dreptul coloniilor bacterine.

15. Agar cu sânge

Geloză nutritivă, pH = 7,2-7,4	90 ml
Sânge defibrinat	5-10 ml

La geloza nutritivă topită şi răcită la 50°C se adaugă sânge defibrinat. Se însămânțează. Se incubează la 37°C.

Interpretare. Coloniile bacteriene se pot dezvolta, fără ca mediul să se modifice; poate avea loc decolorarea şi clarificarea mediului, în dreptul şi în jurul coloniilor datorită unui proces de hemoliză şi hemodigestie; poate avea loc colorarea mediului în galben-verzui sau maroniu, în dreptul şi în jurul coloniilor datorită transformării hemoglobinei în met-hemoglobină sub acțiunea apei oxigenate.

16. Apă peptonată

Peptonă	10 g
Clorură de sodium	5 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 7,4

17. Agar cu malț

Făină de malț	250 g
Agar	15-20 g
Apă de robinet	1000 ml

pH = 3,5

La 1000 ml de apă de la robinet se adaugă 250 g făină de malț. Amestecul se introduce în baie de apă, la 57°C, timp de o oră. Temperatura se ridică treptat până la 63°C, menținându-se la această valoare, până ce reacția pentru amidon devine negativă. Se filtrează prin tifon. Se adaugă serul. Amestecul se fierbe până la topirea agarului, se filtrează şi se repartizează în cantități de 100-200 ml, în baloane. Se sterilizează prin autoclavare. În momentul folosirii, la mediul topit şi răcit la 50°C, se adaugă cantitatea necesară de acid tartric 10% sau acid lactic 5%, pentru obținerea pH-ului de 3,5.

18. Agar Sabouraud

Peptonă	10 g
Glucoză (maltoză)	30-40 g
Agar	15-20 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 5,4-5,6

Se repartizează în recipienți adecvați. Se sterilizează prin autoclavare. Pentru împiedicarea dezvoltării biotei bacterine, la un litru de mediu sterilizat, topit şi răcit se adaugă 20.000 UI penicilină şi 40 mg streptomicină. Streptomicina se poate înlocui cu 200 mg cloramfenicol sau cu 250 mg neomicină.

Mediul cu antibiotice se foloseşte imediat sau în maximum 5-6 zile, dacă se păstrează la frigider. Pentru izolarea unor miceți patogeni, pH-ul mediului va fi de 10,5.

19. Agar cu glucoză şi extract de drojdie

Extract de drojdie	5 g
Glucoză	20 g
Agar	15-20 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 3,5

Se repartizează 100-200 ml în recipienți adecvați. Se sterilizează. În momentul folosirii la mediul topit şi răcit la 50°C, se adaugă acid tartric 10% sau acid lactic în cantitatea necesară obținerii pH-ului de 3,5.

20. Mediul cu arginină-dihidrolază (Sutter)

Peptonă	2 g
Clorură de sodiu	5 g
K_2HPO_4 (fosfat acid de potasiu)	0,3 g
Albastru de bromtimol	0,03 g
L-arginină	10 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte uşor în vederea dizolvării tuturor componenților. Se distribuie porții de 5 ml în tuburi de 13 x 100 mm, închise cu capac cu şurub. Se autoclavează 10 minute la 121°C. pH final = 6,0 ± 0,2.

21. Mediul Bayrd-Parker

Mediul de bază:

Triptonă	10 g
Extract de carne de vită	5 g
Extract de levură	1 g
Piruvat de sodium	10 g
Glicină	12 g
Clorură de litiu $6H_2O$	5 g
Agar	20 g

Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH-ul final = 7,0 ± 0,2. Dacă se intenționează folosirea imediată a mediului, acesta se menține topit la 48-50°C, înaintea adăugării mediului de îmbogățire. Ca alternativă, se poate păstra mediul solidificat la 4°C ± 1°C, 48 de ore. Înainte de folosire mediul se foloseşte. Mediul de îmbogățire este reprezentat de Bacto EY telurit.

Mediul complet:

Se adaugă aseptic 5 ml de mediu de îmbogățire (45-50°C), Bacto EY telurit la o bază topită la 95°C. Se amestecă bine, evitând formarea bulelor şi se fac porții de 15-18 ml care se toarnă în plăci Petri sterile de 15 x 100 mm. Mediul trebuie să fie foarte opac. Plăcile se usucă înainte de folosire.

22. Agar cu bilă-esculină

Extract de carne de vacă	3 g
Peptonă	5 g
Esculină	1 g
Oxgall	40 g

Citrat feric	0,5 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte cu agitare pentru dizolvarea componentelor. Se repartizează în tuburi, se autoclavează 15 minute, la 121°C şi se solidifică în eprubete, în poziţie înlinată. pH final = 6,6 ± 0,2.

23. Agar cu sulfit de bismut (Wilson-Blair)

Peptonă	10 g
Extract de carne de vită	5 g
Dextroză	5 g
N_2HPO_4 (fosfat acid de azot)	4 g
$FeSO_4$	0,3 g
Sulfit de bismut (indicator)	8 g
Verde brilliant	0,025 g
Agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se amestecă bine componentele şi se încălzeşte cu agitare. Se fierbe 1 minut, pentru obţinerea unei suspensii uniforme (precipitatul nu se dizolvă). Se răceşte la 45-50°C. Se formează o suspensie de precipitat, prin agitare uşoară. Se toarnă porţii de câte 20 ml, în plăci Petri sterile. Se lasă plăcile la uscat aproximativ 2 ore, cu capacul întredeschis; se închid plăcile; pH final = 7,6 ± 0,2. Nu se autoclavează.

Plăcile se prepară în ziua premergătoare însămânţării şi se păstrează la întuneric. Selectivitatea se diminuează în decurs de 48 de ore.

24. Bază de agar cu sânge (infuzie de agar)

Infuzie de inimă	375 g
Tiotonă	10 g
Clorură de sodium	5 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte uşor pentru dizolvarea componentelor. Se autoclavează 20 minute la 121°C; pH final = 7,3 ± 0,2.

25. Agar cu infuzie de creier-inimă (0,7%) (BHI) (pentru determinarea enterotoxinei stafilococice)

Se prepară o cantitate adecvată de bulion cu infuzie creier-inimă. Se ajustează pH-ul la 5,3 cu 1 N HCl. Se adaugă agar în concentraţie 0,7%. Se dizolvă prin fierbere uşoară. Se repartizează porţii de 25 ml în tuburi. Se autoclavează 10 minute la 121°C.

26. Bulion şi agar BHI (Brain Heart Infusion)

Infuzie de creier cu carne de viţel	200 g
Infuzie de inimă cu carne de vită	250 g
Peptonă	10 g
Clorură de sodium	5 g
Na_2HPO4 12 H_2O	2,5 g
Dextroză	2 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată prin încălzire uşoară. Se repartizează bulionul în sticle sau tuburi pentru păstrare. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,4 ± 0,2.

Pentru prepararea agarului cu infuzie de creier inimă se adaugă 15 g de agar la 1 litru de bulion BHI. Se încălzeşte pentru dizolvarea agarului, înainte de introducerea în sticle, pentru depozitare. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

27. Bulion cu bilă verde briliant 2% (BGB) (Brilliant Green Bile)

Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
Oxgall	20 g
Verde brilliant	0,0133 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă peptona şi lactoza în 500 ml de apă distilată. Se adaugă 20 g de oxgall deshidratat, dizolvat în 200 ml de apă distilată. pH-ul acestei soluţii trebuie să fie de 7,0-7,5. Se amestecă şi se adaugă apă, până la 975 ml. Se ajustează pH-ul la 7,4. Se adaugă 13,3 ml de verde briliant apos 0,1%, în apă distilată. Se adaugă apă distilată până la un litru. Se repartizează în tuburi de 20 x 150 mm, ce conţin tubuleţe inversate de fermentare de 10 x 75 mm, asigurându-ne că nivelul lichidului acoperă complet flacoanele respective. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,2 ± 0,1.

28. Bulion cu bromcrezol purpuriu

Bază:

Peptonă	10 g
Extract de carne de vită	3 g
Clorură de sodiu	5 g
Bromcrezol purpuriu	0,04 g
Apă distilată	1000 ml

Se adaugă 5 g de carbohidraţi la 1 litru de bază. Se autoclavează 10 minute la 121°C. pH final = 7,0 ± 0,2. Pentru folosirea cu Vibrio parahaemolyticus se adaugă 25 g de clorură de sodiu per litru.

29. Bulion dextroză cu bromcrezol purpuriu (BCP) (Bromcresol Purple Dextrose Broth)

Dextroză	10 g
Extract de carne de vită	3 g
Peptonă	5 g
Bromcrezol purpuriu (1,6% în etanol)	2 ml
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată. Se repartizează în tuburi 12-15 ml. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,0 ± 0,2.

30. Agar semisolid şi bulion Brucella

Triptonă sau tripticază	10 g
Tiotonă sau peptamină	10 g
Dextroză	1 g
Autolizat de levuri	2 g
Clorură de sodiu	5 g
$NaHSO_3$	0,1 g
Apă distilată	1000 ml

Se formează o suspensie din ingrediente, într-un litru de apă distilată şi se amestecă bine. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,0 ± 0,2. Pentru prepararea agarului semisolid Brucella se adaugă 1,8 g de agar şi 10 ml soluţie roşu neutru. Se încălzeşte uşor cu agitare pentru dizolvarea agarului. Se fierbe 1 minut. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

31. Agar Campylobacter pentru screening biochimic

Bază:

Triptonă	10 g
Peptamină	10 g
Glucoză	1 g
Extract de levuri	2 g
Clorură de sodium	5 g
Bisulfit de sodium	0,1 g
Agar	1,8 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată prin încălzire până la fierbere. Se răceşte şi se repartizează în 4 porţii de câte 250 ml.

Soluţia de roşu neutru. Se dizolvă 0,2 g de roşu neutru în etanol, într-un flacon volumetric de 100 ml. Se adaugă apă distilată până la semnul marcat. Se adaugă 2,5 ml de soluţie de roşu neutru la trei din volumele de 250 ml de bază.

Substanțele biochimice. Glicină 1%, NaCl 3,5%, Cisteină 0,02%, Nitrit 1%. Se adaugă 2,5 g glicină la una din porțile de 250 ml ale bazei cu soluție roșu-neutru, 0,75 g NaCl la a doua porție cu soluție de roșu neutru și 0,05 g cisteină la a treia porție cu soluție roșu neutru. Se adaugă 2,5 g, KNO_3, la a patra porție, fără soluție de roșu neutru. Se reglează valoarea de pH la 7,0 ± 0,2 și se împarte în 7-10 ml per tub. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

32. Bulion de îmbogățire pentru *Campylobacter*

Bază:

Pudră Lab-Lemco (Oxoid L 29)	10 g
Peptonă	10 g
NaCl	5 g
Extract de drojdie	6 g
Apă distilată	950 ml

Se repartizează în flacoane de dimensiuni adecvate. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,5 ± 0,2.

33. Agar de izolare pentru *Campylobacter*

Bază:

Bulion nutritiv	25 g
Cărbune bacteriologic	4 g
Hidrolizat de cazeină	3 g
Deoxicolat de sodium	1 g
Sulfat feros	0,25 g
Piruvat de sodium	0,25 g
Agar	12 g
Extract de drojdie	2 g
Apă distilată	1000 ml

Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,4 ± 0,2. După autoclavare și înainte de distribuirea agarului în plăci Petri, se adaugă 100 ml de apă distilată, încălzită și 4,4 ml de soluție de cefoperazonă și 4,4 ml de soluție de cicloheximidă. Se îndepărtează spuma din ultima placă cu un depresor pentru limbă steril. Flambarea plăcii va precipita cărbunele. Plăcile cu agar se feresc de lumină în timpul depozitării.

Suplimentul de antibiotic este compus din cefoperazonă sodică (30 mg) și cicloheximidă (100 mg). Se dizolvă 0,75 g de cefoperazonă sodică în 100 ml de apă distilată. Se sterilizează prin filtrare prin membrane de 0,45 microni. Se dizolvă 2,5 g de cicloheximidă în 20-30 ml, 70% etanol în 100 ml, în flacoane volumetrice. Se adaugă apă distilată până la valoarea gradată și se sterilizează prin filtrare printr-o membrană de 0,45 microni.

34. Agar cu Novobiocină-Cefsulodin-Irgasan (CIN) sau Agar selectiv Yersinia (YSA) (Yersinia Selective Agar)

A. Mediu de bază:	
Peptonă specială	20 g
Extract de drojdie	2 g
Manitol	20 g
Acid piruvic	2 g
NaCl	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 mg/ml)	1 ml
Agar	12 g
Apă distilată	756 ml
B. Soluție de Irgasan 0,40% în 95% etanol Poate fi păstrat la -20°C, o săptămână	1 ml
C. Soluție de dezoxicolat	
Dezoxicolat sodic	0,5 g
Apă distilată	200 ml
Se încălzeşte până la fierbere; se răceşte la 50-55°C.	
D. Hidroxid de sodiu 5N	1 ml
E. Roşu neutru 3 mg/ml	10 ml
F. Cristal violet 0,1 mg/ml	10 ml
G. Cefsulodin 1,5 mg/ml Poate fi păstrat la -70°C	10 ml
Se scoate la temperatura camerei înainte de folosire.	
H. Novobiocină 0,25 mg/ml	10 ml
I. Clorură de stronțiu 10% sterilizată	10 ml

Preparare: Se dizolvă ingredientele soluției A (mediul bazal) în apă, care se fierbe. Se răceşte până la 80°C (prin menținerea în baie de apă de 50°C, timp de 10 minute). Se adaugă soluția B (Irgasan) şi amestecă bine. Se răceşte la 50-55°C. Se adaugă soluția C (dezoxicolat). Soluția trebuie să fie limpede. Se adaugă soluția D şi H. Soluția I se adaugă uşor. Se ajustează pH-ul la 7,4 cu 5N NaOH. Se repartizează în plăci Petri în porții de câte 15-20 ml. Agarul selectiv pentru Yersinia deshidratat preparat comercial (Difco) cu suplimente poate fi substituit. Se urmează instrucțiunile de preparare.

35. Bulion cu ficat mărunțit

Ficat proaspăt de vită	500 g
Peptonă	10 g
K_2HPO_4	1 g
Amidon solubil	1 g
Apă distilată	1000 ml

Se mărunţeşte ficatul şi se adaugă în apă. Se fierbe la foc redus, o oră. Se răceşte. Se ajustează pH-ul la 7,0 şi se fierbe din nou 10 minute. Se filtrează prin tifon steril şi se stoarce lichidul în exces. Se adaugă celelalte ingrediente şi se ajustează pH-ul la 7,0. Se adaugă apă până la 1000 ml. Se filtrează prin hârtie de filtru groasă. Se păstrează bulionul şi carnea separat în congelator. Se adaugă în eprubete ficatul mărunţit. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

36. Agar Christensen

Bază:	
Peptonă	1 g
NaCl	5 g
Dextroză	1 g
KH_2PO_4	2 g
Roşu fenol	0,012 g
Agar	15 g
Apă distilată	900 ml
Concentratul de uree:	
Uree	20 g
Apă distilată	100 ml

Se ajustează pH-ul la 6,8 ± 0,1. Se sterilizează prin filtrare. Se dizolvă agarul în 900 ml de apă distilată şi se adaugă celelalte ingrediente. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la 50°C ± 0,2°C. Se adaugă concentratul de uree. Se amestecă bine şi se repartizează în eprubete sterile. Se toarnă în pante cu bază adâncă.

37. Mediul cu carne fiartă

Inimă de vită	454 g
Peptonă	20 g
Dextroză	2 g
NaCl	5 g
Apă distilată	1000 ml

Se obţine o suspensie de mediu comercial fiert deshidratat în 100 ml de apă rece distilată. Se amestecă şi se lasă să stea 15 minute, pentru ca particulele să se umezească bine; sau se distribuie 1,25 g în tuburi test de 20 x 150 mm, după care se adaugă 10 ml de apă distilată rece şi se amestecă bine pentru ca toate particulele să fie umezite. Se autoclavează 20 minute la 121°C. pH final 7,2.

38. Emulsie de gălbenuş de ou 50%

Se spală ouăle cu o perie tare şi se drenează. Se lasă să se îmbibe o oră în $HgCl_2$ 0,1%. Se drenează soluţia; se înlocuieşte cu 70% etanol şi se

la înmuiat 30 minute; se drenează etanolul; ouăle se sparg aseptic şi se îndepărtează albuşurile; gălbenuşurile se extrag cu o seringă sterilă sau cu o pipetă cu gura largă; se plasează într-un container steril şi se amestecă aseptic cu un volum egal de soluție salină sterilă 0,85%; se păstrează la 4°C, până la folosire.

39. <u>Soluția de gelatinază 5%</u>

Gelatinază	5 g
Apă distilată	100 ml

Se suspendă gelatinaza în apă distilată. Se centrifughează 10 minute la 9.500 rpm şi se sterilizează prin filtrare prin membrane de 0,45 microni. Se repartizează în porții de câte 100 ml în sticle.

40. <u>Bulion Sare-Glucoză-Teepol</u>

Extract de carne de vită	3 g
Peptonă	10 g
NaCl	30 g
Glucoză	5 g
Violet de metal	0,002 g
Soluție Teepol	4 ml
Apă distilată	1000 ml

Se repartizează câte 10 ml de soluție în tuburi de 20 x 150 mm. Dacă trebuie examinate cantități mai mari de probă se folosesc vase cu capace cu şurub ce conțin 225 ml de bulion pentru 25 g de probă. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,4 ± 0,2.

41. <u>Mediul GPS</u>

Gelatină	10 g
NaCl	10 g
K_2HPO_4	5 g
Apă distilată	1000 ml
Agar (dacă se preferă mediul solid)	10 g

Se încălzeşte cu agitare continuă pentru dizolvarea componentelor. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

42. <u>Agar cu infuzie de inimă</u>

Infuzie de inimă	500 g
Triptoză	10 g
Clorhidrat de sodiu	5 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte uşor pentru dizolvare; se toarnă în tuburi de 16 x 150 ml, până la o treime din înălțimea lor; se autoclavează 15 minute la 121°C. Înainte de solidificarea mediului tuburile se înclină pentru obținerea pantelor de 45 cm şi a bazelor de 2-3 cm. pH final 7,4 ± 0,2.

43. <u>Agar Hektoen Enteric (HE)</u>

Peptonă	12 g
Extract de drojdie	3 g
Săruri biliare	9 g
Lactoză	12 g
Sucroză	12 g
Salicină	2 g
Clorură de sodiu	5 g
Tiosulfat de sodium	5 g
Citrat de amoniu feric	1,5 g
Albastru de bromtimol	0,064 g
Fuxină acidă	0,1 g
Agar	13,5 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzesc toate componentele, până la temperatura de fierbere, cu agitare continuă pentru dizolvarea acestora. Nu se fierb mai mult de 1 minut. Se evită supraîncălzirea. Se răceşte în baie de apă. Se repartizează porții de câte 20 ml, în plăci Petri sterile de 15 x 100 mm. Se lasă să se usuce 2 ore cu capacul parțial deschis. pH-ul final 7,6 ± 0,2. Nu se păstrează mai mult de o zi.

44. <u>Bulion cu glucoză Hugh Leifson</u>

Peptonă	2 g
Extract de levură	0,5 g
NaCl	30 g
Dextroză	10 g
Bromcrezol purpuriu	0,015 g
Agar	3 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte cu agitare continuă pentru dizolvarea agarului. Se ajustează pH-ul la 7,4 ± 0,2. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

45. <u>Bulion cu lactoză</u>

Extract de carne de vită	3 g
Peptonă	5 g
Lactoză	5 g

Apă distilată	1000 ml

Pentru *E. coli*: se dizolvă toate ingredientele şi se repartizează în porții de câte 10 ml în tuburi de 20 x 150 mm cu tubulețe de fermentație de 10 x 75 mm inversate. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 6,9 ± 0,2.

Pentru Salmonella se toarnă porții de 225 ml în baloane Erlenmeyer de 500 ml. După autoclavare, timp de 15 minute la 121°C şi imediat înainte de folosire volumul se ajustează aseptic la 225 ml; pH final 6,9 ± 0,2.

46. Mediul Lactoză-Gelatină (pentru *C. perfringens*)

Triptoză	15 g
Extract de drojdie	10 g
Lactoză	10 g
Roşu fenol (soluție)	0,05 g
Gelatină	120 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte pentru dizolvarea triptozei, a extractului de levuri şi a lactozei în 400 ml de apă. Se formează o suspensie de gelatină în 600 ml de apă şi se încălzeşte la 50-60°C cu agitare continuă pentru dizolvare. Se amestecă cele două soluții. Se ajustează pH-ul la 7,5 ± 0,2. Se adaugă roşu fenol şi se amestecă bine. Se repartizează porții de câte 10 ml in tuburi de 16 x 150 mm; se autoclavează 10 minute la 121°C; dacă nu se foloseşte în decurs de 8 ore se elimină aerul prin încălzeşte la 50-70°C, cu 2-3 ore înainte de folosire.

47. Bulion cu Lauril-Triptoză (LT)

Triptoză sau tripticază	20 g
Lactoză	5 g
K_2HPO_4	2,75 g
KH_2PO_4	2,75 g
NaCl	5 g
Lauril sulfat de sodium	0,1 g
Apă distilată	1000 ml

Se repartizează porții de 10 ml în tuburi cu tubulețe de fermentare. Se autoclavează 15 minute la 121°C; pH final 6,8 ± 0,2.

48. Bulion cu Lauril-Triptoză-MUG (LT-MUG)

Triptoză sau tripticază	20 g
Lactoză	5 g
K_2HPO_4	2,75 g
KH_2PO_4	2,75 g

NaCl	5 g
Lauril sulfat de sodiu	0,1 g
4-metil umbeliferil beta-D-glucuronid (MUG)	50 mg
Apă distilată	1000 ml

Se prepară bulionul LT şi se adaugă MUG. Se dizolvă prin încălzire uşoară dacă este necesar. Se repartizează câte 10 ml în tuburi care conțin tubulețe de fermentare inversate; se autoclavează 15 minute la 121°C; pH final 6,8 ± 0,2.

49. Agar Levine cu eozină-albastru de metilen (L-EMB)

Peptonă	10 g
Lactoză	10 g
K_2HPO_4	2 g
Agar	15 g
Eozină	0,4 g
Albastru de metilen	0,065 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă toate ingredientele prin fierbere într-un litru de apă. Se repartizează câte 100 sau 200 ml în recipienți corespunzători şi se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,1 ± 0,2.

50. Agar cu lizină, arginină şi fier

Peptonă	5 g
Extract de levuri	3 g
Glucoză	1 g
N-Lizină	10 g
L-Arginină	10 g
Citrat feric de amoniu	0,5 g
Tiosulfat de sodium	0,04 g
Bromcrezol purpuriu	0,02 g
Agar	15 g

Se ajustează pH-ul la 6,8; se încălzeşte prin fierbere şi se repartizează câte 5 ml în tuburi de cultură cu capac înşurubabil; se autoclavează la 121°C pentru 12 minute; se solidifică în poziție înclinată pentru obținerea de pante.

51. Agar Mac Conkey

Peptonă	20 g
Lactoză	10 g
Săruri biliare	1,5 g
Clorură de sodium	5 g
Roşu neutru	0,03 g

Cristal violet	0,001 g
Agar	13,5 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele prin încălzire uşoară, prin agitare continuă. Se fierb 1-2 minute. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la 45-50°C şi se împarte în porţii de 20 ml, care se repartizează în plăci Petri sterile. Se usucă la temperatura camerei, cu capacul închis. Nu se folosesc decât plăci perfect uscate. pH final 7,1 ± 0,2.

52. Agar cu extract de malț

Extract de malț	30 g
Agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă prin fierbere. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se repartizează câte 20-25 ml în plăci Petri sterile. pH final 5,5 ± 0,2.

53. Bulion cu extract de malț

Extract de malț	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se ajustează pH-ul la 4,7 ± 0,2. Se repartizează în tuburi sterile. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

54. Mediul de mobilitate (pentru *B. cereus*)

Tripticază	10 g
Extract de drojdii	2,5 g
Dextroză	5 g
Na_2HPO_4	2,5 g
Agar	3 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă agarul prin încălzire. Se repartizează porţii de 100 ml în sticle de 170 ml. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,4 ± 0,2. Se răceşte la 50°C. Se repartizează aseptic porţii sterile de 2 ml, în tuburi de 13 x 100 mm. Se păstrează la temperatura camerei cel mult 2 zile înainte de folosire.

55. Mediul de mobilitate nitrat, tamponat (pentru *C. perfringens*)

Extract de carne de vită	3 g
Peptonă (Difco)	5 g
KNO_3	1 g
Na_2HPO_4	2,5 g
Agar	3 g

Galactoză	5 g
Glicerină	5 ml
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă toate ingredientele cu excepția agarului. Se ajustează pH-ul la 7,3 ± 0,1. Se adaugă agarul şi se încălzeşte pentru dizolvare. Se împarte în porții de 11 ml, care se repartizează în tuburi de 16 x 150 mm. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Dacă nu se foloseşte în 4 ore se încălzeşte 10 minute în apă fiartă, apoi se răceşte brusc prin introducerea în apă rece.

56. Mediul MP-VP

Peptonă tamponată	7 g
Glucoză	5 g
K_2HPO_4	5 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în 800 ml de apă, prin încălzire uşoară. Se filtrează. Se răceşte la 20°C şi se diluează la 1 litru. Se autoclavează 12-15 minute la 121°C. pH final 6,9 ± 0,2.

Pentru izolarea lui V. parahaemolyticus se adaugă 30 g NaCl per litru. Pentru Salmonella se repartizează 10 ml în tuburi test şi se autoclavează 12-15 minute la 121°C.

57. Agar cu peptonă-extract de carne de vită-glicogen (PBG)

Peptonă	10 g
Extract de carne de vită	10 g
Glicogen	4 g
Clorură de sodiu	5 g
Lauril-sulfat de sodiu	0,1 g
Albastru de bromtimol	0,1 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte cu agitare pentru dizolvarea agarului. Se repartizează în flacoane corespunzătoare. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,0 ± 0,1.

58. Bulion cu cianură de potasiu (KCN)

Cianură de potasiu	0,5 g
Polipeptonă	3 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	0,225 g
Na_2HPO_4	5,64 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele şi se autoclavează 15 minute la 121°C. Mediul se răceşte şi se refrigerează la 5-8°C. pH final 7,6 ± 0,2. Se dizolvă 0,5 g KCN în 100 ml de apă distilată sterilă rece (5-8°C). Se foloseşte o pipetă cu bulă şi se adaugă 15 ml soluție de KCN rece la 1 l de bază sterilă rece. Nu se pipetează cu gura. Se amestecă şi se repartizează aseptic câte 1,0-1,5 ml în tuburi sterile.

59. Mediul Rappaport-Vassiliadis

Bulionul bază:

Triptonă	5 g
Clorură de sodium	8 g
KH_2PO_4	1,6 g
Apă distilată	1000 ml

Soluția de clorură de magneziu:

$MgCl_2$ $6H_2O$	400 g
Apă distilată	1000 ml

Soluția de verde de malachit oxalat:

Verde de malachit oxalat	0,4 g
Apă distilată	100 ml

Pentru prepararea mediului complet se combină 1000 ml de bulion bază, 100 ml de soluție clorură de magneziu şi 10 ml de soluție de verde de malachit oxalat (volumul total al mediului complet este de 1110 ml). Se repartizează câte 10 ml de mediu complet în tuburi de 16 x 150 mm. Se autoclavează 15 minute la 115°C. pH final 5,5 ± 0,2. Se păstrează la frigider şi se foloseşte în decurs de o lună.

60. Bulion şi Agar Sabouraud cu Dextroză

Polipeptonă sau Neopeptonă	10 g
Dextroză	40 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă complet componentele şi se repartizează în sticle în porții de 40 ml. pH final 5,8. Se autoclavează 15 minute la 118°C-121°C. Pentru agarul Sabouraud cu dextroză se prepară bulionul şi se adaugă 15-20 g de agar. pH final 5,6 ± 0,2. Se repartizează în tuburi şi se solidifică în pantă. Se autoclavează 15 minute la 118°C-121°C.

61. Bulion cu tripticază şi sare

Tripticază	10 g
Extract de drojdii	3 g
Apă distilată	1000 ml

Se adaugă 0, 60, 80 şi 100 g de NaCl la 1 litru de bază, preparată din bulion 0, 6, 8 şi 10% bulion, pentru testele de toleranță la sare. Se

autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,5 ± 0,2.

62. Bulion Shigella

Bază:

Triptonă	20 g
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	2 g
NaCl	5 g
Dextroză	1 g
Tween80	1,5 ml
Apă distilată	1000 ml

Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,0 ± 0,2.

Soluția de novobiocină: se cântăresc 50 mg de novobiocină şi se adaugă la 1 litru de apă distilată; se sterilizează prin filtrare, prin membrane de 0,45 microni; se adaugă 2,5 ml de concentrat la 225 ml de bază.

63. Mediul SIM

Peptonă	30 g
Extract de carne de vită	3 g
Fier peptonizat	0,2 g
Tiosulfat de sodium	0,025 g
Agar	3 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele prin încălzire uşoară şi agitare ocazională. Se fierbe 1-2 minute, până când se dizolvă agarul. Se repartizează 6 ml de mediu în tuburi cu capac înşurubabil. Se sterilizează prin autoclavare 15 minute la 121°C. Mediul se solidifică în poziție verticală.

64. Agar Simmons

Citrat de sodiu $2H_2O$	2 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	1 g
$NH_4H_2PO_4$	1 g
$MgSO_4$	0,2 g
Albastru de bromtimol	0,08 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte uşor pentru topirea ingredientelor. Se fierbe 1-2 minute pentru dizolvarea agarului. Se repartizează în tuburi de 13 x 100 mm până la 1/3 din înălțimea acestora. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Înainte de solidificarea mediului tuburile se înclină pentru obținerea pantelor de

45 cm şi a bazei de 2-3 cm. pH final 6,9 ± 0,2.

65. Agar tiosulfat-citrat-săruri biliare-sucroză (TCBS)

Extract de drojdie	5 g
Peptonă	10 g
Sucroză	20 g
Tiosulfat de sodiu $5H_2O$	20 g
Citrat de sodiu $2H_2O$	10 g
Colat de sodium	3 g
Oxgall	5 g
NaCl	10 g
Citrat feric	1 g
Albastru de bromtimol	0,04 g
Albastru de timol	0,04 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte pentru dizolvarea ingredientelor şi se menține la temperatura de fierbere 1-2 minute. Nu se autoclavează. Se repartizează câte 20 ml în plăci Petri sterile. pH final 8,6.

66. Agar tripticază soia

Peptonă triptică	15 g
Peptonă fitonă	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte cu agitare pentru dizolvarea agarului. Se fierbe un minut. Se repartizează în tuburi sau flacoane. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,3 ± 0,2. Pentru folosirea lui la izolarea lui V. parahaemolyticus se adaugă 25 g de NaCl.

67. Bulion triptic de soia cu ampicilină (TSBA)

Peptonă triptică	15 g
Peptonă fitonă	3 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2,5 g
Dextroză	2,5 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte şi se agită uşor pentru dizolvare şi dispersare. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,3 ± 0,2. După răcire la 40-50°C şi sterilizare prin filtrare ampicilina trebuie să aibă concentrația finală de 30 mg/litru.

68. Mediul Voges-Proskauer modificat

Peptonă proteazică	7 g
NaCl	5 g
Dextroză	5 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă şi se ajustează pH-ul dacă este necesar. Se repartizează câte 5 ml în tuburi sterile. Se autoclavează 10 minute la 121°C. pH final 6,5 ± 0,2.

69. Agar XLD (xiloză-lizin-dezoxicolat)

Extract de drojdie	3 g
L-lizină	5 g
Xiloză	3,75 g
Lactoză	7,5 g
Sucroză	7,5 g
Dezoxicolat de sodiu	2,5 g
Citrat feric de amoniu	0,8 g
Tiosulfat de sodiu	6,8 g
Clorură de sodiu	5 g
Agar	15 g
Roşu fenol	0,08 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte prin agitare uşoară, până la temperatura de fierbere. Nu se depăşeşte temperatura de fierbere. Se repartizează în plăci când mediul s-a răcit la 50°C. Se lasă să se usuce aproximativ 2 ore, cu capacul parțial deschis. Se închid plăcile. pH final 7,4 ± 0,2. Nu se păstrează mai mult de o zi.

70. Bază de agar selectiv Yersinia

Extract de drojdie	2 g
Peptonă	17 g
Peptonă protează	3 g
Manitol	20 g
Dezoxicolat de sodiu	0,5 g
Colat de sodiu	0,5 g
NaCl	1 g
Piruvat de sodiu	2 g
Sulfat de magneziu	10 mg
Agar	13,5 g
Roşu neutru	30 mg
Cristal violet	1 mg

Irgasan	4 mg
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte uşor până la dizolvarea completă a componentelor. Se sterilizează 15 minute la 121°C. Nu se depăşeşte temperatura de fierbere. Se răceşte la 45-50°C şi se adaugă aseptic 10 ml de supliment antimicrobian Yersinia, rehidratat (CN). Se amestecă bine şi se repartizează în plăci Petri sterile.

Suplimentul antimicrobian Yersinia (CN):

Cefsulodin	4 mg
Novobiocină	2,5 mg

71. Agar Wagatsuma

Extract de drojdie	3 g
Peptonă	10 g
Clorură de sodiu	70 g
K_2HPO_4	5 g
Manitol	10 g
Cristal violet	0,001 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzeşte cu agitare uşoară pentru dizolvarea agarului. Se ajustează pH-ul la 8,0 ± 0,2. Nu se autoclavează. Se răceşte la 50°C. Se spală globulele roşii de om sau de iepure de 3 ori cu soluție fiziologică salină. Se adaugă 5% din volumul acestei suspensii la mediul răcit. Se amestecă şi se repartizează în plăci Petri (plăcile trebuie să fie bine uscate înainte de folosire).

72. Bulion tetrationat

Polipeptonă	5 g
Săruri biliare	1 g
Carbonat de calciu	10 g
Tiosulfat de sodiu $5H_2O$	30 g
Apă distilată	1000 ml

Se suspendă ingredientele într-un litru de apă distilată, se amestecă şi se încălzesc, până ajung la temperatura de fierbere. Se răceşte la 45°C. Se depozitează la 5-8°C.

pH final = 8,4 ± 0,2.

73. Agar TSI (Triple sugar iron)

Mediul 1

Polipeptonă	20 g

NaCl	5 g
Lactoză	10 g
Sucroză	10 g
Glucoză	1 g
Fe $(NH_4)_2(SO_4)_2\ 6H_2O$	0,2 g
$Na_2S_2O_3$	0,2 g
Roşu fenol	0,025 g
Agar	13 g
Apă distilată	1000 ml

Mediul 2

Extract din carne de vită	3 g
Peptonă	15 g
Peptonă protează	5 g
Glucoză	1 g
Lactoză	10 g
Sucroză	10 g
$FeSO_4$	0,2 g
NaCl	5 g
$Na_2S_2O_3$	0,3 g
Roşu fenol	0,024 g
Agar	12 g
Apă distilată	1000 ml

Se suspendă ingredientele din *Mediul 1* în apă distilată, se amestecă bine şi se încălzesc cu agitare uşoară. Se fierb 1 minut pentru dizolvarea completă a ingredientelor. Se autoclavează 15 minute la 118°C. *Mediul 2* se prepară la fel ca şi Mediul 1, numai că autoclavarea se face 15 minute la 121°C. Tuburile se solidifică în poziție înclinată pentru a obține o pantă de 4-5 centimetri şi o bază de 2-3 centimetri. pH-ul final este de 7,3 ± 0,2 pentru Mediul 1 şi 7,4 ± 0,2 pentru Mediul 2.

74. <u>Bulion cu lauril sulfat</u>

Triptoză	20 g
Lactoză	5 g
Clorură de sodiu	5 g
Fosfat dipotasic	2,75 g
Fosfat monopotasic	2,75 g
Lauril sulfat de sodiu	0,10 g

pH final = 6,8 ± 0,2

75. <u>Bulion cu uree</u>

Uree	20 g

Extract de drojdie	0,1 g
KH_2PO_4	0,091 g
Na_2HPO_4	0,095 g
Roşu fenol	0,01 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată. Nu se încălzeşte. Se sterilizează prin filtrare, prin membrane de 0,45 µm. Se repartizează aseptic porții de 1,5-3 ml în tuburi sterile. pH final = 6,8 ± 0,2.

76. <u>Bulion cu malonat</u>

Extract de drojdie	1 g
$(NH_4)SO_4$	2g
K_2HPO_4	0,6 g
KH_2PO_4	0,4 g
NaCl	2 g
Malonat de sodiu	3 g
Dextroză	0,25 g
Albastru de bromtimol	0,025 g
Apă distilată	1000 ml

Se fierb ingredientele pentru dizolvare. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se repartizează câte 20-25 ml în plăci Petri sterile. pH final 5,5 ± 0,2.

77. <u>Mediul TSA (tripticază-soia-agar)</u>

Peptonă triptică	15 g
Peptonă-fitonă	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă agarul prin încălzire. Se repartizează în tuburi. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,3 ± 0,2. Pentru *V. parahaemolyticus* se adaugă 25 g NaCl.

78. <u>Mediul MYP (manită, gălbenuş de ou, polimixină)</u>

Digerat peptic din țesut animal	10 g
Extract de carne	1 g
D-manitol	10 g
NaCl	10 g
Roşu fenol	0,25 g
Agar	15 g

pH final = 7,1 ± 0,2.

Procedeu: Se dizolvă 46 grame din mediul deshidratat, în 900 ml de

apă distilată şi se fierbe până la dizolvarea totală a ingredientelor. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la 55°C. Se adaugă în mod aseptic soluția de sulfat de polimixină B (FD 003) sterilizată prin filtrare, în aşa fel ca antibioticul să reprezinte 100 U.I./ml de mediu şi 100 ml emulsie de gălbenuş de ou (FD 045) sterilă la 1000 ml mediu. Se amestecă bine şi se toarnă în plăci Petri. Mediul are un aspect de gel clar sau uşor opalescent, roşu-oranj.

79. Bulion cu nitrat

Extract de carne de vacă	3 g
Peptonă	5 g
KNO_3	1 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele. Se repartizează câte 5 ml în tuburi de 16 x 125 mm. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,4 ± 0,2.

80. Agar cu tirozină

1. Baza. Se prepară agarul nutritiv. Se repartizează porții de 100 ml în sticle de 170 ml. Se autoclavează la 121°C timp de 15 minute. Se răceşte la 48°C.

2. Suspensia de tirozină. Se suspendă 0,5 g de L-tirozină în 10 ml de apă distilată în tuburi de cultură. Se amestecă bine ingredientele cu un mixer Vortex. Se autoclavează 15 minute la 121°C.

3. Mediul final. Se combină 100 ml de bază cu suspensia de tirozină sterilă. Se amestecă cu grijă prin agitarea sticlelor de 2-3 ori. Se repartizează aseptic câte 3,5 ml în tuburi de 13 x 100 ml. Se formează pante şi se răcesc rapid pentru a preveni separarea tirozinei.

81. Bulion cu lizozim

1. Baza. Se prepară bulionul nutritiv. Se repartizează porții de 99 ml în sticle de 170 ml. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la temperatura camerei înainte de folosire.

2. Soluția de lizozim. Se dizolvă 0,1 g de lizozim în 65 ml de soluție sterilă de NaCl 0,01N. Se încălzeşte până începe să fiarbă, 20 de minute. Se diluează 100 ml cu soluție NaCl 0,01N. Între timp se dizolvă 0,1 g lizozim în 100 ml de apă distilată. Se sterilizează prin filtrare prin membrane de 0,45 μm. Mediul trebuie să fie steril. Se adaugă 1 ml de soluție de lizozim la 99 ml de bulion nutritiv. Se amestecă şi se repartizează în poziții de câte 2,5 ml în tuburi sterile de 13 x 100 mm.

82. Bulion Demi-Fraser

Protează peptonă	5 g

Hidrolizat enzimatic de cazeină	5 g
Extract de drojdie	5 g
Extract de carne de bovine	5 g
Clorură de sodiu	20 g
Clorură de litiu	3 g
Fosfat disodic	12 g
Fosfat monopotasic	1,35 g
Esculină	1 g
Citrat feri-amoniacal	0,5 g

pH final = 7,2 ± 0,2.

Mediul deshidratat în cantitate de 57,85 se suspendă în 990 ml de apă distilată şi se fierbe până la dizolvarea completă. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la 50°C. Se amestecă bine şi se repartizează în recipienți adecvați.

83. Agar PALCAM (pentru identificarea Listeriozei)

Digerat peptic din țesuturi animale	23 g
Amidon	1 g
Clorură de sodiu	5 g
Manitol	10 g
Citrat feri-amoniacal	0,5 g
Esculină	0,8 g
Glucoză	0,5 g
Clorură de litiu	15 g
Roşu fenol	0,08 g
Agar	13 g

pH final = 7,0 ± 0,2.

Mediul deshidratat (6,9 g) se suspendă în 1000 ml apă distilată şi se fierbe până la dizolvarea completă. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se răceşte la 50°C şi se adaugă aseptic conținutul rehidratat în 5 ml apă distilată sterilă, al unei fiole cu supliment selectiv pentru Listeria (PALCAM), FD 061, format din 50.000 UI polimixină, 10 mg cetozidimă şi 2,5 mg acriflavină hidroclorică. Se amestecă bine şi se toarnă în plăci Petri. Mediul are aspect de gel uşor opalescent sau clar, de culoare roşie.

84. Bulion GST (Glucoză-Sare-soluție Teepol)

Extract de carne de vită	3 g
Peptonă	10 g
NaCl	30 g
Glucoză	5 g
Violet metil	0,002 g
Soluție Teepol	4 ml

Apă distilată	1000 ml

Se repartizează porții de 10 ml în tuburi de 20 x 150 mm. Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final 7,4 ± 0,2.

85. Agar TSC (Triptoză-Sulfit-Cicloserină)

Triptoză	15 g
Extract de drojdie	5 g
Soiatonă	5 g
Citrat feric de amoniu	1 g
Metabisulfit de sodiu	1 g
Agar	20 g
Apă distilată	1000 ml

Se încălzesc cu agitare uşoară pentru dizolvare. Se ajustează pH-ul la 7,6 ± 0,2. Se repartizează porții de 250 ml în recipienți de 500 ml. Se autoclavează 15 minute la 121°C. Se menține mediul la 50°C, înainte de folosire.

Soluția D-cicloserină. Se dizolvă 1 g D-cicloserină (pudră cristalină albă) în 200 ml de apă distilată. Se sterilizează prin filtrare şi se păstrează la 4°C, până la folosire.

Mediul final. Se adaugă 20 ml soluție D-cicloserină la 250 ml de bază. Se adaugă 20 ml la 50% emulsie de gălbenuş de ou. Se amestecă bine şi se repartizează 18 ml în plăci Petri de 15 x 100 ml. Se acoperă plăcile cu un prosop şi se lasă la temperatura camerei 24 de ore înainte de folosire.

86. Bulion TPGY (tripticază-peptonă-glucoză-drojdie)

Tripticază	50 g
Peptonă	5 g
Extract de drojdie	20 g
Dextroză	4 g
Tioglicolat de sodiu	1 g
Apă distilată	1000 ml

Se dizolvă ingredientele şi se repartizează în tuburi. Se autoclavează 10 minute la 121°C. pH final = 7,0 ± 0,2. Se refrigerează la 5°C.

87. Agar pentru anaerobi cu gălbenuş de ou

Ouă proaspete	2
Extract de drojdie	5 g
Triptonă	5 g
Peptonă-protează	20 g
NaCl	5 g
Agar	20 g

Apă distilată 1000 ml

Se autoclavează 15 minute la 121°C. pH final = 7,0 ± 0,2.

Diluanți

1. Apă distilată tamponată

a) Soluția stoc:

Fosfat monopotasic	34 g
Apă distilată	500 ml

Se ajustează pH-ul la 7,2 cu NaOH (aproximativ 175 ml) şi se aduce volumul la un litru cu apă distilată.

b) se iau 1,25 ml din soluția A şi se completează la volumul de 1 litru cu apă distilată. Aceasta reprezintă soluția de lucru care se repartizează în recipienți şi se sterilizează.

2. Soluția 2% (1,25%) citrat de sodiu

Citrat de sodiu anhidru	20 (12,5) g
Apă distilată	1000 ml

3. Ser fiziologic

Clorură de sodiu	8,5 g
Apă distilată	1000 ml

4. Ser fiziologic fenolat

Clorură de sodiu	8,5 g
Fenol	2,5 g
Apă distilată	1000 ml

5. Ser fiziologic peptonat

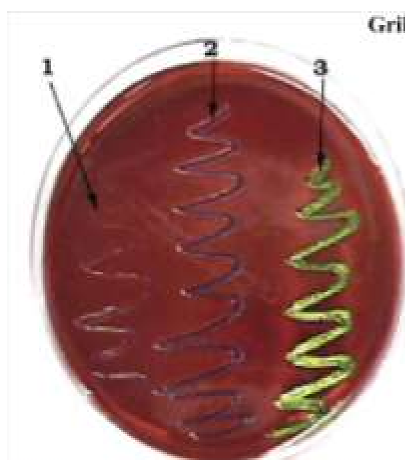
Clorură de sodiu	8,5 g
Peptonă	1,0 g
Apă distilată	1000 ml

pH = 7,0

După amestecarea ingredientelor conform rețetelor specificate, se repartizează volumele dorite în recipienți corespunzători. Se sterilizează prin autoclavare 15 minute, la 121°C.

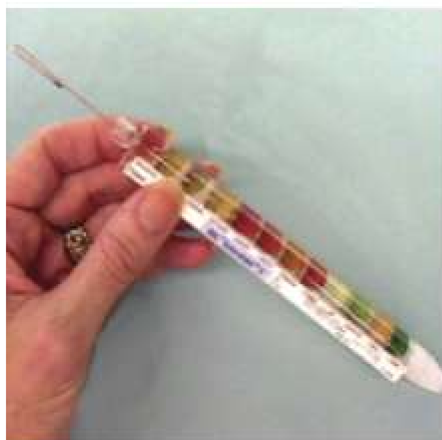
Pentru uşurarea mojarării şi omogenizării alimentelor cu conținut mare de grăsime, la diluanții folosiți pentru prima diluție (1/5 sau 1/10) este indicată adăugarea la rețete a tergitolului sau a produsului Tween80 în proporție de 1%.

Grilă de autoevaluare



În imaginea alăturată apar 3 genuri bacteriene diferite, cultivate pe mediul EMB. Acestea sunt numerotate de la 1 la 3. Care concluzie este adevărată?

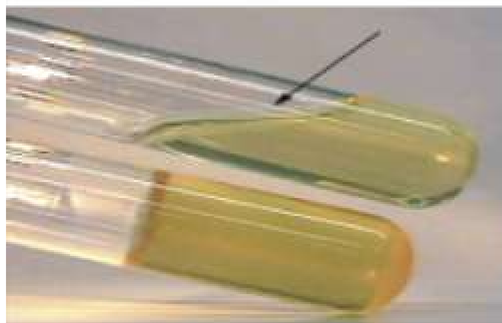
a) Bacteria 1 este Gram pozitivă şi incapabilă să fermenteze glucoza.
b) Bacteria 2 este Gram negativă şi fermentează sucroza
c) Bacteria 3 este Gram negativă şi fermentează lactoza
d) Toate cele trei bacterii sunt Gram negative şi fermentează sucroza
e) Nici o concluzie nu este adevărată



Sistemul microtest din imaginea alăturată este folosit pentru identificarea:

a) Cocilor Gram pozitivi
b) Cocilor Gram negativi
c) Bacililor Gram pozitivi
d) Bacililor Gram negativi
e) Spirochetelor

Staphylococcus aureus este de obicei:
a) alfa hemolitic;
b) beta hemolitic;
c) gama hemolitic;
d) delta hemolitic;
e) nehemolitic



Cultura pură bacteriană a fost însămânţată într-un mediu cu gelatină. Tuburile cu mediu au fost incubate 48 de ore şi apoi refrigerate timp de 30 minute.
Săgeata indică un microorganism:

a) capabil să degradeze gelatina;
b) incapabil să degradeze gelatina;
c) capabil să coaguleze plasma citratată;
d) incapabil să coaguleze plasma citratată;
e) capabil să producă catalază



Fiecare dintre cele două bulioane cu triptonă este inoculat cu bacterii diferite. Se adaugă câteva picături de reactiv E-Kovacs.
Săgeata indică un test:

a) Voges-Proskauer pozitiv;
b) Voges-Proskauer negativ;
c) Indol pozitiv;
d) Indol negativ;
e) Roşu metil pozitiv.



Săgeata din imagine indică ca bacteria analizată:

a) produce acizi din glucoză;
b) produce baze din glucoză;
c) produce indol prin degradarea triptofanului;
d) nu produce indol prin degradarea triptofanului;
e) este capabilă să utilizeze citratul ca unică sursă de carbon



Bacteriile cultivate pe mediul MSA (mannitol-salt-agar), indicate de sageată sunt:
a) capabile să fermenteze manitolul; probabil *Stp. epidermidis;*
b) capabile să fermenteze manitolul; probabil *Stp. aureus;*
c) incapabile să fermenteze manitolul; probabil *Stp. epidermidis;*
d) incapabile să fermenteze manitolul; probabil *Stp. aureus;*
e) capabile să fermenteze glucoza; probabil *Stp. aureus;*



Imaginea prezintă dezvoltarea unor bacterie într-un mediu de mobilitate. Cea din tubul al doilea este:

a) mobilă, posedă flageli;
b) imobilă, fără flageli;
c) mobilă, fără flageli;
d) imobilă, posedă flageli



Rezultatele testului roşu-metil prezentate pentru două bacterii diferite. Care concluzie este corectă?
a) Tubul 1 indică un pH acid ca rezultat al fermentării lactozei;
b) Tubul 2 indică un pH acid ca rezultat al fermentării lactozei;
c) Tubul 1 indică un pH acid ca rezultat al fermentării glucozei;
d) Tubul 2 indică un pH acid ca rezultat al fermentării glucozei;
e) Nici una ditre concluzii nu este corectă.

Patogenii care de obicei sunt beta hemolitici, includ:

a) *Staphylococcus aureus*
b) *Streptococcus pyogenes* (grup A)
c) *Streptococcus pneumoniae*
d) răspunsurile a) şi b);
e) răspunsurile a), b) şi c).

Norme de protecția muncii în laboratorul de microbiologie

Pentru protejarea personalului operator (medici, studenți, biologi etc.) din laboratorul de microbiologie este necesar să se cunoască şi să se respecte următoarele norme de protecția muncii:

1. Este obligatorie folosirea halatului de protecție, care asigură reducerea riscului de contaminare, efectuarea corespunzătoare a operațiunilor de sterilizare, protejarea hainelor împotriva acțiunii diferiților agenți chimici;
2. Păstrarea lucrurilor personale în locuri special amenajate, departe de masa de lucru;
3. Păstrarea într-o ordine perfectă a laboratorului şi încăperilor anexe;
4. Efectuarea experimentelor în cadrul lucrărilor practice de către studenți nu se realizează decât după primirea instrucțiunilor preliminare de la cadrul didactic;
5. În timpul lucrărilor practice, pentru a preveni contaminarea se interzic deplasările, vorbitul, fumatul, mâncatul etc;
6. Dacă masa de lucru a fost contaminată cu produse care conțin germeni, se va anunța cadrul didactic răspunzător; se va acoperi zona respectivă cu un tifon îmbibat cu atiseptice şi numai după ce a trecut timpul necesar distrugerii acestora se efectuează curățirea propriu-zisă a locului respectiv;
7. Dacă pe masa de lucru s-au răspândit substanțe chimice periculoase, ele vor fi în prealabil neutralizate, după care se recurge la îndepărtarea lor;
8. Mediile însămânțate se incubează la termostat, culturile folosite se trimit la infecte pentru autoclavare, frotiurile şi pipetele se inscripționează şi se depun în cutii speciale;
9. După fiecare lucrare se curăță şi se dezinfectează mesele de lucru, pentru ca la începerea unei alte lucrări practice să existe condiții corespunzătoare de lucru;
10. Nu se va atinge aparatura de laborator sau culturile pregătite în

prealabil pentru lucrările practice, decât după acceptul cadrului didactic răspunzător;

11. Se vor respecta normele minime de asepsie şi se va menține distanța corespunzătoare față de becul de gaz;

12. Nu se vor amesteca la întâmplare substanțele, coloranții, reactivii, care se găsesc în laborator;

13. Microscoapele se vor folosi cu mare atenție, iar la terminarea lucrului se vor strânge corespunzător, se vor aranja la marginea mesei de lucru şi se va şterge oleul de cedru cu pulpa degetului, după care se vor acoperi cu huse;

14. Înainte de a părăsi laboratorul, studentul respectiv va trece la spălarea şi dezinfecția mâinilor;

Respectarea acestor norme minime în laboratorul de microbiologie va permite desfăşurarea lucrărilor practice în condiții de siguranță deplină.

Posibilități de transmitere a infecțiilor de laborator la om

În laborator, agenții infecțioşi pot pătrunde în organism pe următoarele căi:

- **mucoasa digestivă (ingestia)** – în cursul pipetării cu gura, introducerea în gură a degetelor şi obiectelor de pe mesele de laborator (creioane, țigări, alimente) contaminate prin scurgeri, stropiri neobservate sau insuficient dezinfectate. Riscul inhalării se realizează prin aerosoli (culturi liofilizate) la deschiderea sau spargerea fiolelor. Stropii de fluid infecțios ajunşi în ochi pot determina infecții grave;
- **transmiterea transcutanată** a infecțiilor în laborator se poate realiza prin înțepături cu ace de seringă, pipete Pasteur sau cioburi de sticlă contaminate; prin contaminarea plăgilor tăiate, zgâriate, a abraziunilor.

Evoluția infecțiilor de laborator este atipică şi frecvent gravă. OMS a stabilit 4 niveluri de exigență, în ceea ce priveşte clasificarea laboratoarelor din punct de vedere al exigenței: nivelurile 1 şi 2 corespund laboratoarelor de bază, nivelul 3, laboratoarelor cu regim restrictiv şi nivelul 4, celor cu regim de maximă restricție.

Ne interesează nivelurile 1 şi 2, care corespund sistemelor de învățământ şi sănătate publică.

Nivel	Aplicat în:	Mijloace de protecție	Locul de muncă
1 (de bază)	Învățământul secundar	Tehnologie microbiologică foarte bună	Lucru pe masa deschisă
2 (de bază)	Învățământul universitar Sănătate publică	Halat de protecție Semnalizarea riscului biologic Tehnologie microbiologică foarte bună	Lucru pe masa deschisă Boxă de siguranță, clasa I sau a II-a (pentru activități generatoare de aerosoli)

În laboratorul de microbiologie diferențiem trei bariere antiinfecțioase:

- primare – care previn răspândirea unui microb în laborator;
- secundare – care protejează personalul în cazul depășirii accidentale, de către microorganisme a barierelor primare;
- terțiare, care previn răspândirea în comunitate a microorganismelor care au depășit barierele primare și secundare.

Bibliografie selectivă

1. *** Bureau of Community Environmental Health, Division of Environmental Health, Florida Department of Health (2005). Annual Report, Florida. Food and Waterborne Illness Surveillance and Investigation.
2. *** Codex Alimentarius Commision. Procedural Manual. Eleventh edition. Food and United Nation World Health Organization, Rome, 2000;
3. *** Codex Alimentarius, Volume one B, General Requirements (Food Hygiene) FAO- WHO, october 1997;
4. *** Codex Comitee of Food Hygiene, Thirtieth Session, Washington D.C. october 20-24, 1997;
5. *** Council Directive 91/492/EEC (1991). Health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. Official Journal of the European Communities L268: 1-14.
6. *** Evaluarea riscurilor in cadrul sistemelor de management al igienei, http//www.dqsromania.ro; 2005
7. *** Food and Agriculture Organization Of The United Nations , Roma 1998, Food Quality and Safety Systems – A Training Manual on Food Hygiene and the Hazard Analisis and Critical Control Point (HACCP) System http://www.fao.org, Roma 1998;
8. *** Foodborne Viral Infections U:\wpdocs\pac\info stats & nrs\Electronic versions\Foodborne Viral Infections.doc. Feb.2008.
9. *** Guidebook for the preparation of Plans and the Generic HACCP Models U.S.Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (FSIS) Office of Policy, Program Development and Evluation (OPPDE) http://www.fsis.usda.gov/index.htm,1999;
10. *** Hotărârea Guvernului nr. 924/2005 privind aprobarea Regulilor generale pentru igiena produselor alimentare, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 804 din 5 septembrie 2005, ce transpune Regulamentul Parlamentului European şi al Consiliului Uniunii Europene nr. 852/2004/CE.
11. *** Hotărârea Guvernului nr. 954/2005 privind aprobarea Regulilor specifice de igienă pentru alimente de origine animală, publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 805 din 5 septembrie 2005, ce transpune Regulamentul Parlamentului European şi al Consiliului Uniunii Europene nr. 853/2004/CE.
12. *** http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm. Accesat la data 11.02.2008
13. *** http://www.ebi.ac.uk/integr8/QuickSearch.do?action=doOrgSearch&organismName=Lactococcus+lactis Accesat 20.02.2008
14. *** http://www.genoscope.cns.fr Accesat 20.02.2008
15. *** Manualul inginerului de industrie alimentara. Editura Tehnica, Bucuresti, vol 2, 1999 [1338-1410]
16. *** Recommended Internațional Code of Practice – General Principles of Food Hygiene (CAC/RCP 1 1969, Rev.3, 1997);
17. *** Siguranta alimentara HACCP ! HACCP !- Revista ANAMOB NEWS nr.127/15 feb.2004;
18. *** UK Statutory Instrument No. 1263 (1989). The Sludge (Use in Agriculture) Regulations 1989. HMSO, London.
19. *** Viral Gastroenteritis Sub-Committee of the PHLS Virology Committee (1993). Outbreaks of gastroenteritis associated with SRSVs. PHLS Microbiology Digest 10: 2-8.

20. *** Working Party of the PHLS Salmonella Committee (1995). The prevention of human transmission of gastrointestinal infections, infestations, and bacterial intoxications. Communicable Disease Report 5: Review No.11, R158 - R172.
21. ***Food and Drug Administration Center for food Safety and Applied Nutrition – Aprilie 1998- A HACCP Principles Guide for Operators of Food Establishments at the Retail Level http://vm.cfsan.fda.gov ;
22. ***Metodologie din 30 octombrie 2001privind examenul medical la angajarea în muncă, examenul medical de adaptare, controlul medical periodic şi examenul medical la reluarea muncii Publicat în Monitorul Oficial, Partea I nr. 836 din 27 decembrie 2001
23. Ala'Aldeen, D. A. A. (2007). "Neisseria and moraxella". In Greenwood, David; Slack, Richard; Peitherer, John; & Barer, Mike (Eds.), Medical Microbiology (17th ed.), p. 258. Elsevier. ISBN 978-0-443-10209-7.
24. Andrews W.1. , Manual of food quality control, Rev. 1, Microbiological Analysis, FAOUN, Roma, 1992
25. Apostu S.2. , Microbiologia produselor alimentare - Lucrări practice, vol. III, Editura Risoprint, Cluj-Napoca, 2006
26. Banu Constantin, 2000, Tratat de stiinte si tehnologi maltului si a berii, Editura Tehnica, Bucuresti, [177-179]
27. Banwart, G. J. 1989. Basic food microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
28. Battista, J.R. Against All Odd: The Survival Strategies of Deinococcus radiodurans., 1997, p. 203-224
29. Bauman, H.E. (1990), Concept, Development and Aplication, Food Tehnology;
30. Berzescu P., s.a., 1981, Tehnologia berii si a maltului, Editura Ceres, Bucuresti, [13, 108,109,126]
31. Björkroth, J., and W. Holzapfel. 2006. Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella, p.267 -319. In M. Dworkin (ed.), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, vol. 4, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY.
32. Brad Segal,1975, Tehnologia generala a industriei alimentare, Galati, [419-423]
33. Câmpeanu G.; IF Dumitru. Progrese în Biotehnologie. Bucureşti, Ed. Ars Docendi, 2002.
34. Chan, V. L. Microbial genome, in Bacterial genomes and infectious diseases / edited by Voon L. Chan, Philip M. Sherman, Billy Bourke. Humana Press, Totowa, NewJersey 2006
35. Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of Vagococcus fluvialis gen. nov., sp. nov. J. Appl. Bacteriol. 67:453–460
36. Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. & Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. J Appl Bacteriol 75, 595±603.
37. Corlett DA (1991) – Regulatory verification of HACCP system;
38. Corlett DA (1991) Initiating HACCP in your food company by establishing accountabilies, goals and a project plan;
39. Coundron, P.E., Payne, J.M., Markowitz, S.M. (1991). Pneumonia and empyema infection associated with a Bacillus species that resembles B. alvei. J. clin. Microbiol. 29, 1777-1779

40. Daniels RW, (1991)Apling HACCP to New Generation Refrigerated Foods at Retail and Beyond
41. Dean KH, (1990),HACCP and Food Safety in Canada
42. Dellaglio, F. & Torriani, S. (1986). DNA±DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria from maize silage. J Appl Bacteriol 60, 83±93.
43. Dellaglio, F., Vescovo, M., Morelli, L. & Torriani, S. (1984). Lactic acid bacteria in ensiled high-moisture corn grain: physiological and genetic characterization. Syst Appl Microbiol 5, 534±544.
44. Diaconescu Andra, 3. Microbiologie specială, Editura AgroTehnica, Bucureşti, 2002
45. Escherichia. Taxonomy Browser. NCBI. Retrieved on 2007-11-30.
46. Euzéby J. P., 4. LPSN, 2007.
47. Feng P, Weagant S, Grant, M (2002-09-01). Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual (8th ed.). FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition. Retrieved on 2007-01-25.
48. Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science 269, 496–512.
49. G.M. Ni'matuzahroh, M. Gilewicz, M. Guiliano & J.C. Bertrand (May 1999). "In-vitro study of interaction between photooxidation and biodegradation of 2-methylphenanthrene by Sphingomonas sp 2MPII". Chemosphere 38 (11): 2501-2507. PMID 10204235.
50. Gutnick D. Potential Application of Acinetobacter in Biotechnology in Acinetobacter Molecular Biology. Gerischer U (editor), Caister Academic Press. 2008.
51. Hammes,W. P. & Vogel, R. F. (1995). The genus Lactobacillus. In The Genera of Lactic Acid Bacteria, pp. 19±54. Edited by B. J. B. Wood & W. Holzapfel. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
52. Hogg S. (2005) Essential Microbiology. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate England
53. Hopulele Traian, 1979, Tehnologia maltului si a beri, [15-26, 50-53, 165-171, 173-174, 224-228]
54. Ivana Simona Bacteriologie generală, Editura Ştiinţelor Medicale, Bucureşti, 2005
55. Ivana Simona. Bacteriologie veterinară specială, Editura Ceres, Bucureşti, 2002
56. Ivana Simona. Tratat de bacteriologie medical-veterinară şi introducere în micologie, Editura Ştiinţelor Medicale, 2006
57. Jablecki J, Norton SA, Keller GR, DeGraw C, Ratard R, Straif-Bourgeois S, Holcombe JM, Quilter S, Byers P, McNeill M, Schlossberg D, Dohony DP, Neville J, Carlo J, Buhner D, Smith BR, Wallace C, Jernigan D, Sobel J, Reynolds M, Moore M, Kuehnert M, Mott J, Jamieson D, Burns-Grant G, Misselbeck T, Cruise PE, LoBue P, Holtz T, Haddad M, Clark TA, Cohen A, Sunenshine R, Jhung M, Vranken P, Lewis FMT, Carpenter LR (2005). Infectious Disease and Dermatologic Conditions in Evacuees and Rescue Workers After Hurricane Katrina - Multiple States, August-September, 2005. Mortality and Morbidity Weekly Report 54: 1-4
58. James M. J., Martin J. L., David A. G.8. , Modern food microbiology 7th ed., Ed. Springer, California, 2005
59. Jay, J. M., M. J. Loessner, and D. A. Golden. 2005. Modern food microbiology, 7th ed. Springer, New York, NY.
60. John E. Rushing, P.A. Curtis, A.M. Fraser*, D.P. Green, D.H. Pilkington, D.R. Ward and L.G. Turner Basic Food Microbiology, www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/ microbiologybasic.pdf, accesat

08.01.2008
61. Joseph S, Colwell R, Kaper J (1982). Vibrio parahaemolyticus and related halophilic Vibrios. Crit Rev Microbiol 10 (1): 77-124. PMID 6756788
62. Kandler, O., Schillinger, U. & Weiss, N. (1983). Lactobacillus halotolerans sp. nov., nom. rev. and Lactobacillus minor sp. nov., nom. rev. Syst Appl Microbiol 4, 280±285.
63. Kulwichit W, Nilgate S, Chatsuwan T, et al. (2007). "Accuracies of Leuconostoc phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays". BMC Infectious Diseases 7: 69.:10.1186/1471-2334-7-69.
64. Lane, DJ., B. Pace, GJ. Olsen, et al. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6955-6959.
65. Mara, D. and Cairncross, S. (1991). Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture. WHO: Geneva.
66. Martinez-Murcia, A. J. & Collins, M. D. (1990). A phylogenetic analysis of the genus Leuconostoc based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol Lett 70, 73±84.
67. Martinez-Murcia, A. J., Harland, N. M. & Collins, M. D. (1993). Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. J Appl Bacteriol 74, 532±541.
68. Maunder, D. T. 1969. Spoilage problems caused by molds of the Byssochlamys Paecilomyces group, p. 12-16. In Byssochiamys seminar abstracts. Res. Circular no. 20, New York State Agric. Exp. Sta., Geneva.
69. Milbourne, K. (1983). Thermal tolerance of Lactobacillus viridescens in ham. Meat Sci 9, 113±119.
70. Nasima Ali, Paul R. Herron, Meirwyn C. Evans and Paul J. Dyson. Osmotic regulation of the Streptomyces lividans thiostrepton-inducible promoter, ptipA. Microbiology (2002), 148, 381-390
71. Nicoleta Croitor, 2002, Tehnologia generala a industriei alimentare, Editura fundatiei universitatii, Dunarea de jos, Galati, [111-130]
72. Niven, C. F., Jr & Evans, J. B. (1957). Lactobacillus viridescens nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discolouration of cured meat pigments. J Bacteriol 73, 758±759.
73. Peri C, (1993), Hazard Analisis Model for Food Process; Food Science and Tehnology Today;
74. Pot, B., L. A. Devriese, J. Hommez, C. Miry, K. Vandemeulebroecke, K. Kersters, and F. Haesebrouck. 1994. Characterization and identification of Vagococcus fluvialis strains isolated from domestic animals. J. Appl. Bacteriol. 77:362–369
75. Put, H. M. C., and J. T. Kruiswijk. 1968. Microbiological changes in canned pasteurized strawberries by Byssochiamys. Ann. Inst. Pasteur Lille 19:171-190.
76. Răpuntean Ghe., Răpuntean S.,9. Bacteriologie veterinară specială, Editura Academic Press, Cluj-Napoca, 2006
77. Ray, B. 2004. Fundamental food microbiology, 3rd Ed. CRC Press, Boca Ratan, FL.
78. Richardson, D. C. 1965. Incidence of Byssochlamys fulva in Queensland grown canned strawberries. Queensl. J. Agric. Anim. Sci. 22:347-350.
79. Rotaru Gabriela, (1996), Asigurarea inocuității alimentare cu ajutorul metodei HACCP;
80. Rotaru Gabriela, (1997), HACCP în industria alimentară Editura Academică Galați;
81. Savu C (1999), Poluarea mediului şi prezența substanțelor toxice în alimente – Controlul calității alimentelor Editura Semne Bucureşti;

82. Savu C (2002) - Igiena şi controlul produselor de origine animală, Editura Semne, Bucureşti;
83. Schliefer, K. H., J. Kraus, C. Dvorak, R. Kilpper-Balz, M. D. Collins, and W. Fischer. 1985. Transfer of Streptococcus lactis and related streptococci to the genus Lactococcus gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6:183–195 Schliefer, K. H., and R. Kilpper-Balz. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. Syst. Appl. Microbiol. 10:1–19.
84. Schmidtke, L. M., and J. Carson. 1994. Characteristics of Vagococcus salmoninarum isolated from diseased salmonid fish. J. Appl. Bacteriol. 77:229–236
85. Southwick, F.S.; D.L Purich. More About Listeria. University of Florida Medical School. Retrieved on 7 March 2007.
86. Stanescu V., (1998), Igiena si controlul alimentelor , Editura Fundației ; Romania de Maine Bucuresti;
87. Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. & Komagata, K. (2000). Lactobacillus acidipiscis sp. nov. and Weissella thailandensis sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 50, 1479-1485.
88. Teuşdea V. (1996) Igiena Alimentelor şi Protecția Mediului. Vol. I, Ed. Lider, Bucureşti.
89. Thompson, Andrea. "E. coli Thrives in Beach Sands", Live Science, June 4, 2007. Retrieved on 2007-12-03.
90. Tisler J.M. (1991), The Food and Drug Administrations perspective on HACCP, Food Tehnology;
91. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Listeria monocytogenes and Listeriosis. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Biology (2003). Retrieved on 2007-03-07.
92. Vagiakou-Voudris E, Mylona-Petropoulou D, Kalogeropoulou E, Chantzis A, Chini S, Tsiodra P, Malamou-Lada E (2002). "Scand J Infect Dis" 34 (10): 766–7. PMID 12477331.
93. Wallbanks, S., A. J. Martinez-Murcia, J. L. Fryer, B. A. Phillips, and M. D. Collins. 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus Carnobacterium and related lactic acid bacteria and description of Vagococcus salmoninarum sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40:224–230
94. Wayne, L.G., DJ. Brenner, R.R. Colwell, et al. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:463-464.
95. Woese, CR. 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev. 51:221-271.
96. Yousef, A. E., and C. Carlstrom. 2003. Food microbiology: a laboratory manual. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ
97. Yutaka Yano,* Akihiko Nakayama, Kenji Ishihara, and Hiroaki Saito. Adaptive Changes in Membrane Lipids of Barophilic Bacteria in Response to Changes in Growth Pressure. Appl Environ Microbiol, February 1998, p. 479-485, Vol. 64, No. 2